

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Zrinka Gale

Analiza sadržaja srebra i promjena stabilnosti
nanočestica u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju i Laboratoriju za biljnu proteomiku Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Peharec Štefanić i u Laboratoriju za analitičku kemiju Zavoda za analitičku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sande Rončević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić, na velikoj pomoći i trudu iskazanima tijekom eksperimentalnog rad, znanju, strpljenju i savjetima tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Sande Rončević na predanom znanju, savjetima, iskustvu, pomoći prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.

Hvala neposrednom voditelju dipl. ing. Ivanu Nemetu, na korisnim savjetima, strpljenju, uloženom trudu i vremenu.

Hvala kolegi Bernardu Marcijušu na svoj ukazanoj pomoći, savjetima, izdvojenom vremenu i ugodnom društvu.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji koja je uvijek uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

ANALIZA SADRŽAJA SREBRA I PROMJENA STABILNOSTI NANOČESTICA U KLIJANCIMA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)

Zrinka Gale

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) se koriste zbog protubakterijskog djelovanja u mnogim komercijalno dostupnim proizvodima, uključujući pesticide, ali predstavljaju potencijalnu opasnost za okoliš zbog svoje toksičnosti, reaktivnosti i akumuliranja u biljkama. Zbog svoje velike površine u odnosu na volumen, AgNP su vrlo reaktivne i podložne otpuštanju iona srebra, što potencijalno povećava njihovu toksičnost. Također, pokazano je da AgNP nisu stabilne u eksperimentalnom mediju i da su sklone interakciji s komponentama u otopini, što može utjecati na njihovu toksičnost i upotrebljivost. U svom diplomskom radu analizirala sam sadržaj srebra (Ag) u tkivu klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.), u zaostalom talogu MS medija i otopini u kojoj su klijale sjemenke te promjenu stabilnosti AgNP u MS mediju. Sjemenke duhana isključivala sam deset dana u tekućem MS mediju s dodatkom AgNP stabiliziranih različitim omotačima (citrat, bPEI, PEG) ili srebrovog nitrata (AgNO_3) pri koncentracijama od 25, 50, 75, 100, 125 i 150 μM , a u slučaju kontrole bez dodatka Ag. Desetog dana tretmana sa svim tipovima AgNP najviša koncentracija Ag izmjerena je u tkivu klijanaca, zatim u zaostalom talogu te najniža u otopini. Nakon tretmana s AgNO_3 koncentracija Ag u tkivu bila je niža u odnosu na tretmane s AgNP, dok su koncentracije Ag u otopini bile ujednačene. Koncentracija Ag u talogu bila je najniža nakon tretmana s AgNP-bPEI. Snimke dobivene transmisijском elektronskom mikroskopijom pokazuju da su AgNP bile sferične i jednakih veličina te pojedinačne ili u nakupinama u matičnim otopinama kao i u eksperimentalnim otopinama neposredno nakon miješanja AgNP i MS medija (prije dodatka sjemenki). Desetog dana tretmana u talogu MS medija, čestice Ag uglavnom su bile sfernog oblika, ali različitih veličina, pojavljivale su se pojedinačno ili u nakupinama te agregirale.

(58 stranica, 19 slika, 14 tablica, 32 literaturnih navoda, 6 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: nanočestice srebra, koncentracija srebra, transmisijска elektronska mikroskopija, atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu

Voditelji: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc. i Dr. sc. Sanda Rončević, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Dr. sc. Sanda Rončević, izv. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

SILVER CONTENT ANALYSIS AND CHANGE OF NANOPARTICLES STABILITY IN TOBACCO SEEDLINGS (*Nicotiana tabacum* L.)

Zrinka Gale

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Silver nanoparticles (AgNP) are used for their antimicrobial properties in many available commercial products, including pesticides, but they can pose a risk to the environment due to their toxicity, reactivity and accumulation in plants. Because of their large surface area to volume ratio, AgNPs are highly reactive and subjected to silver ions release which potentially increases their toxicity. Moreover, it has been shown that AgNPs are not stable in the experimental medium and they react with components in the solution which may affect the toxicity and usability. In this graduation thesis, I analysed the silver (Ag) content in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings tissue, in the residual precipitate of MS medium and in the solution in which seeds germinated. The change in the stability of AgNPs in the MS medium was also examined. Tobacco seeds were germinated for ten days in liquid MS medium containing either AgNPs stabilized with different coatings (citrat, bPEI, PEG) or silver nitrate (AgNO_3) at concentrations of 25, 50, 75, 100, 125 and 150 μM . In the case of control, no Ag was added. On the 10th day of the treatment with all types of AgNPs, the highest concentration of Ag was measured in the seedlings tissue, then in the residual precipitate, while the lowest values were obtained in the solution. After the treatment with AgNO_3 , the concentration of Ag in the tissue was lower than in the AgNP treatments, while the Ag concentrations in the solution were equal for all treatments. Concentration of Ag in the residual precipitate was the lowest after the treatment with AgNP-bPEI. Transmission electron microscopy images showed that the AgNPs were spherical, of the same size and individually dispersed or in the clusters in the stock solutions as well as in experimental solutions immediately after mixing AgNPs and MS medium (before seeds were added). On the 10th day of the treatment, in the residual precipitate of MS medium AgNPs were mostly spherical but of different sizes, individually dispersed or clustered and they aggregated.

(58 pages, 19 figures, 14 tables, 32 references, 6 supplements, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library.

Key words: silver nanoparticles, silver concentration, transmission electron microscopy, atomic emission spectroscopy with inductively coupled plasma

Supervisor: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, Asst.Prof.. and Dr. sc. Sanda Rončević, Assoc.Prof.

Reviewers: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Dr. sc. Sanda Rončević, Assoc. Prof.

Dr. sc. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Thesis accepted:

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Nanotehnologija i nanomaterijali	1
1.1.1 Nanočestice srebra	1
1.1.2 Omotači nanočestica.....	2
1.2 Srebrov nitrat (AgNO_3)	3
1.3 Vrsta <i>Nicotiana tabacum</i> L. kao modelni organizam.....	4
1.4 Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM).....	5
1.5 Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES)	6
1.5.1 Opis rada instrumenta ICP-AES.....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	9
3. MATERIJALI I METODE.....	10
3.1 MATERIJALI	10
3.1.1 Nanočestice srebra	10
3.1.2 Biljni materijal	10
3.1.3 Modificirani tekući medij	11
3.1.4 Kemikalije	13
3.2 METODE	14
3.2.1 Opis instrumenta	14
3.2.2 Provedba tretmana.....	15
3.3 Transmisijska elektronska mikroskopija	17
3.3.1 Analiza agregacije nanočestica srebra u hranidbenom mediju prije i desetog dana tretmana klijanaca duhana	17
3.3.2 Analiza agregacije ionskog srebra u hranidbenom mediju prije i desetog dana tretmana klijanaca duhana	18
3.4 Analiza srebra pomoću Prodigy High Dispersion ICP-AES spektrometra	19
3.4.1 Analiza koncentracije srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS mediju) i sjemenkama duhana.....	19

3.4.2 Analiza koncentracije srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS mediju) u prisutnosti nanočestica i iona srebra	20
3.5 Analiza srebra desetog dana tretmana klijanaca duhana	23
3.5.1 Mjerenje koncentracije srebra u otopini desetog dana tretmana	23
3.5.2 Mjerenje koncentracije srebra u zaostalom talogu desetog dana tretmana	23
3.5.3 Mjerenje koncentracije srebra u tkivu klijanaca duhana desetog dana tretmana	24
3.6 Validacija metode ICP-AES.....	26
3.7 Statistička obrada podataka	26
4. REZULTATI	28
4.1 Analiza nanočestica srebra transmisijom elektronskom mikroskopijom	28
4.1.1 Vizualizacija nanočestica srebra u matičnim otopinama	28
4.1.2 Vizualizacija i analiza nanočestica srebra u hranidbenom mediju prije i desetog dana tretmana klijanaca duhana	29
4.1.3 Vizualizacija i analiza ionskog srebra u hranidbenom mediju prije i desetog dana tretmana klijanaca duhana	31
4.2 Koncentracije srebra mjerene pomoću Prodigy High Dispersion ICP-AES spektrometra.....	32
4.2.1 Koncentracija srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS medij) i sjemenkama duhana.....	32
4.3 Koncentracija srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS mediju) u prisutnosti nanočestica i iona srebra	33
4.4 Sadržaj srebra u kontrolnim uzorcima desetog dana isključivanja klijanaca duhana.....	35
4.5 Statistička procjena kvalitete rezultata analize srebra desetog dana tretmana klijanaca duhana nanočesticama srebra i ionskim srebrom.....	36
4.5.1 Koncentracije srebra u otopini u kojoj su klijale sjemenke	36
4.5.2 Koncentracije srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju.....	37
4.5.3 Sadržaj srebra u tkivu klijanaca duhana	38
4.6 Analiza sadržaja srebra desetog dana tretmana klijanaca duhana	40

4.6.1 Raspodjela koncentracija srebra u sustavu otopine, taloga i tkiva klijanaca duhana.....	40
4.6.2 Raspon koncentracije srebra u otopini desetog dana tretmana nanočesticama srebra i ionskim srebrom.....	42
4.6.3 Raspon koncentracije srebra u sustavu zaostalog taloga desetog dana tretmana nanočesticama srebra i ionskim srebrom	43
4.6.4 Raspon koncentracije srebra u sustavu tkiva klijanaca desetog dana tretmana nanočesticama srebra i ionskim srebrom	44
4.6.5 Raspon koncentracije srebra u sustavu otopine desetog dana tretmana nanočesticama srebra.....	45
4.6.6 Raspon koncentracije srebra u sustavu zaostalog taloga desetog dana tretmana nanočesticama srebra.....	46
4.6.7 Raspon koncentracije srebra u sustavu tkiva klijanaca desetog dana tretmana nanočesticama srebra.....	47
5. RASPRAVA	49
6. ZAKLJUČAK	55
7. LITERATURA	56
Prilog 1	I
Prilog 2	II
Prilog 3	III
Prilog 4	IV
Prilog 5	V
Prilog 6	VI
Životopis	VII

Popis kratica i oznaka

AgNP- Nanočestice srebra

bPEI- Razgranati polietilenimin

CRM- Standardni referentni uzorak listova rajčice (Tomato leaves (NIST-1573a))

deH₂O- Destilirana voda

ICP-AES- Metoda atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu

MiliQ- Ultračista voda (Merck Millipore 18 MΩ cm)

MS medij- Hranidbeni medij Murashige-Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata

p.a.- Oznaka za čistoću kemikalija (pro analysis)

PEG- Polietilen glikol

ppm- Parts per million ($\mu\text{g g}^{-1}$)

TEM- Transmisijaska elektronska mikroskopija

UV-VIS- Ultraljubičasto zračenje-vidljiva svjetlost

1. UVOD

1.1 Nanotehnologija i nanomaterijali

Nanotehnologija je skup disciplina koje se bave istraživanjem, razvojem i primjenom struktura, uređaja i sustava nanometarskih (10^{-9} m) veličina (Luoma 2008). Atkins i suradnici 2009. godine kažu kako je nanotehnologija skup procedura za manipulaciju tvarima s ciljem stvaranja korisnih struktura nanometarskih veličina. Nanotehnologija podrazumijeva multidisciplinarnost te je povezana s biologijom. Ako pogledamo organizme koji su razvili sposobnost manipulacije svjetlom i tvarima na atomskoj skali veličina da bi stvorili strukture specifične funkcije kao npr. pohrana informacije i replikacija jasno je da su neki biološki materijali nanomaterijali (Atkins i sur. 2009). U tom pogledu molekula DNA je ultimativni nanomaterijal. Fotosinteza je drugi primjer biološke nanotehnologije gdje nanostrukture aspsorbiraju svjetlost i na kraju pretvaraju svjetlosnu energiju u biološki korisnu kemijsku energiju. Nanotehnologija je poznata stoljećima te je u prošlosti nalikovala više umjetnosti nego znanosti. Na primjer srebrne i zlatne soli bile su korištene kao boje za staklo (vitraje) gdje metalni atomi formiraju nanočestice. Nadalje metalni nanopigmenti su žarište biomedicinske nanotehnologije jer označuju molekulu DNA i druge nanočestice.

Nanomaterijali su čestice nanovelikine. Nanomaterijale možemo podijeliti u tri grupe: nanofilmovi (imaju jednu dimenziju između 1 nm i 100 nm), nanocjevčice (imaju dvije dimenzije između 1 nm i 100 nm) i nanočestice (imaju sve tri dimenzije između 1 nm i 100 nm) (Sekhon, 2014). Zbog svojih jedinstvenih kemijskih i fizikalnih svojstava koriste se u medicini, prehrambenoj, kozmetičkoj i elektroničkoj industriji.

1.1.1 Nanočestice srebra

Nanočestice su nakupine atoma čiji zajednički radijus iznosi između 1 i 100 nm. Tipično je da se sastoje od 1 do 10^5 atoma (Bhushan 2010). Nanočestice možemo nazvati nanomaterijalima s tri dimenzije nanovelikine (Luoma 2008). Odlikuje ih velika površina naspram malog volumena što im daje specifična mehanička, optička i električna svojstva (Nalwa 1999). Nadalje takav omjer površine i volumena daje im kemijska svojstva koja je za sada teško definirati. Zbog velike površine nanočestica u odnosu na njihov volumen, velika je reaktivnost istih, odnosno velik je potencijal otpuštanja iona srebra iz nanočestica srebra (Beer i sur. 2012). One reagiraju s biološkim sustavom na nepredvidljiv način (Beer i sur. 2012).

Danas se vode rasprave o pozitivnim i negativnim učincima nanočestica srebra (AgNP). Poznato je da su nanočestice srebra korištene u komercijalnim proizvodima prije više od 100 godina iako se u staroj literaturi ne koristi prefiks nano (Nowack i sur. 2011).

Nanočestice srebra imaju antimikrobna svojstva pa se koriste u dezinfekciji medicinskih uređaja i pročišćavanju vode u aparatima (Eftaiha 2009). Mogu se naći i u proizvodima tekstilne industrije, pakiranju hrane, medicinskim proizvodima i proizvodima za kućanstvo i pesticidima (Eftaiha 2009). Budući da su od davnina u širokoj uporabi one mogu predstavljati rizik za okoliš i ljudsko zdravlje (Beer i sur. 2012). Budući da biljke imaju značajnu ulogu u akumulaciji i bioraspodjeli mnogih ekoloških tvari, smatra se da bi mogle biti pod utjecajem AgNP i biti uključene u njihov transport i nagomilavanje u hranidbenim lancima (Rico i sur. 2011). Biljke mogu biti izložene nanočesticama srebra neizravno, putem proizvoda koje ljudi korištenjem oslobađaju u okoliš (Luoma 2008); i izravno primjenom komercijalno dostupnih proizvoda korištenih u poljoprivredi (Sekhon 2014). Naime, uporaba poljoprivrednih proizvoda koji sadrže AgNP, kao što su umjetna gnojiva i pesticidi, već je na veliko započela i srebro je danas prihvaćen agrokemijski proizvod jer uklanja neželjene mikroorganizme u tlu i hidroponičkim sustavima (Sharon i sur. 2010).

1.1.2 Omotači nanočestica

Omotači stabiliziraju nanočestice različitim mehanizmima. Za nanočestice obložene citratom to su elektrostatski mehanizmi (odbijanje naboja), za čestice stabilizirane razgranatim polietileniminom (bPEI) to su elektrosterički mehanizmi, a za čestice stabilizirane polietilen glikolom (PEG) to su sterički mehanizmi (Sharma i sur. 2013). Tablica 1. prikazuje mehanizam stabilizacije nanočestica srebra za razne omotače. Nadalje, citrat je jedan od najčešće korištenih organski omotača nanočestica srebra jer on omogućava učinkovito raspršenje nanočestica. Osim toga, omotači daju određeni naboj nanočesticama pa su tako nanočestice stabilizirane citratom negativno nabijene, nanočestice stabilizirane PEG-om su neutralne, a nanočestice stabilizirane bPEI-om su pozitivno nabijene (Banić 2017). Nadalje toksičnost nanočestica ovisi ne samo o veličini čestica i njihovoj koncentraciji već i o vrsti omotača (Silva i sur. 2013).

Površina nanočestica i organski omotači utječu na transport i pokretljivost nanočestica u okolišu (Sharma i sur. 2013). Pri proučavanju samih AgNP koji su stabilizirani različitim omotačima treba uzeti u obzir: ionsku jakost, redoks reakcije, pH vrijednost, svjetlost, tip biološkog sustava (Sharma i sur. 2013).

Tablica 1. Popis mehanizama stabilizacije nanočestica srebra (AgNP) uz razne omotače

Klasifikacija omotača	Vrsta omotača	Mehanizam stabilizacije AgNP-a
Anorganski	Karbonati	Elektrostatski
Prirodni organski spojevi	Citrati	Elektrostatski
	Glukuronska kiselina	Elektrostatski
Ionski surfaktanti	Natrijev dodecil-sulfat (SDS)	Elektrostatski
Sintetski polimeri	Razgranat polietilenimin (bPEI)	Elektrosterički
	Polietilen glikol (PEG)	Sterički
	Polivinilpirolidon (PVP)	Sterički
Prirodni polimeri	Dekstran	Sterički
Prirodni peptidi	Kazein	Elektrosterički

1.2 Srebrov nitrat (AgNO_3)

Najvažniji spojevi srebra pripadaju oksidacijskom stanju +1. Jedan od takvih spojeva je srebrov nitrat (AgNO_3). Srebrov nitrat je ionski spoj, lako dostupan na tržištu i topljiv u vodi. Srebrov nitrat nastaje otapanjem srebra u nitratnoj kiselini koja može biti različitih koncentracija (Filipović i Lipanović 1985). Iz koncentrirane vodene otopine nitratne kiseline i srebra, srebrov nitrat iskristalizira u bezbojnim kristalima koji se lako otapaju u vodi (Filipović i Lipanović 1985). Srebro ima veliki standardni elektrodni potencijal (+0.8 V) pa se otapa u kiselinama koje imaju oksidacijsko djelovanje kao što su vruća koncentrirana sulfatna kiselina i nitratna kiselina (Filipović i Lipanović 1985). Srebrov nitrat upotrebljava se uvijek kada je u vodenim otopinama potreban srebrov ion, Ag^+ . Vodena otopina srebrovog nitrata oksidira kožu, odnosno koža pocrni jer se izlučuje elementarno srebro u obliku sitnih kristalića. Svjetlost koja pada na tako izlučene, nasumično orijentirane kristaliće, odbija se u svim smjerovima te je mala vjerojatnost da dopre do oka promatrača pa metal djeluje crno. Koristi se za proizvodnju zrcala, u medicini i kao reagens u analitičkoj kemiji.

Nadalje važan je njegov utjecaj na biološke sustave. Srebrov nitrat je korišten u istraživanju regulacije rasta biljaka i morfogenezi u sustavima *in vitro* i *in vivo* (Kumar i sur. 2009). Treba uzeti u obzir da utjecaj srebrovog nitrata nije jednak za sve biljke.

1.3 Vrsta *Nicotiana tabacum* L. kao modelni organizam

U svom diplomskom radu provodila sam istraživanja na klijancima duhana (*Nicotiana tabacum* L.) sorte Berley. Duhan je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice pomoćnica (Solanaceae). Biljka je porijeklom iz Južne Amerike, a u Europu je najprije donesena u Španjolsku i Portugal. Duhan je danas rasprostranjen širom svijeta zbog dobre prilagođenosti klimatskim uvjetima i tlima.

Biljka duhana može narasti do 3 m visine. Zeleni listovi prekriveni su žljezdastim dlačicama, naizmjenično postavljeni i mogu narasti do dužine 60-100 cm. Dvospolni cvjetovi rastu na vrhovima stabljika čineći metličaste cvatove. Boja cvjetova je u rasponu od bijele, preko ružičaste, do crvene, a dosežu veličinu do 5 cm. Plod je tobolac u kojem se nalazi velik broj jajolikih sjemenki.

Biljka duhana se proizvodi zbog listova koji se upotrebljavaju za pušenje (cigarete, cigare, lule), žvakanje ili ušmrkavanje. Usprkos štetnosti, uživanje duhanskih proizvoda još uvijek je popularno te uzgoj duhana i prateća industrija imaju iznimno veliki ekonomski značaj. Listovi duhana sadržavaju alkaloid nikotin koji se koristi u farmaceutskoj industriji i prehrambenoj industriji kao aditiv. Iz sjemenki duhana dobiva se ulje koje se koristi za proizvodnju boja, lakova i sapuna. Nadalje ulje sjemenki duhana može poslužiti kao biogorivo (Veljković i sur. 2006). Prilikom uzgoja duhana za ekonomske svrhe često se upotrebljavaju pesticidi koji sadrže ione srebra pa je nužno utvrditi kako ioni srebra utječu na rast i razvoj biljke duhana te utvrditi koncentraciju srebra u samom tkivu biljke.

Biljka duhana koristi se kao modelni organizam u istraživanjima u molekularnoj biologiji, fiziologiji bilja, kulturi tkiva i genetičkom inženjerstvu. Biljka duhana je pogodan modelni organizam u istraživanjima jer se lagano transformira pod utjecajem nekih faktora, relativno je lako pratiti promjene i ima kratko generacijsko vrijeme (Balen 2016). Nadalje, duhan je čest modelni organizam u istraživanjima abiotičkog stresa jer je relativno tolerantan na stresne uvjete te je lako dostupan (Balen 2016). Abiotički stres podrazumijeva negativni učinak neživih čimbenika na žive organizme što proizlazi iz njihovog suviška ili nedostatka u fizičkom i kemijskom okolišu (Balen 2016). Osim toga, genom duhana je sekvenciran pa je prikladan za istraživanja proteina. Vranova i suradnici 2002. godine analiziraju ekspresiju gena kod duhana u uvjetima koji uzrokuju oksidacijski stres. Nadalje, Bajan 2017. godine istražuje utjecaj AgNP

na oksidacijski stres u biljkama duhana, a Banić 2017. prati utjecaj AgNP na promjenu u ultrastrukturi, proteomu i fotosintetskoj učinkovitosti klijanaca duhana. Osim toga, biljke duhana se relativno lako regeneriraju iz određenih biljnih dijelova. Perica u svom istraživanju 1993. godine prati regeneraciju kultivara C 104 Berley iz meristema i primordijalnih listića aksilarnih pupova te zaključuje da se biljke duhana jednom uvedene u kulturu tkiva mogu jednostavno i brzo razmnožavati nasađivanjem nodalnih segmenata na hranjivu podlogu. Sve gore navedeno upućuje na to da je duhan čest i prigodan modelni organizam u istraživanjima.

1.4 Transmisijaska elektronska mikroskopija (TEM)

Postoje dva osnovna tipa elektronskih mikroskopa, a to su transmisijski elektronski mikroskop (TEM) i pretražni elektronski mikroskop (engl. scanning electron microscope - SEM). U elektronskom mikroskopu postoji izvor elektrona, a za sabiranje ili rasipanje zraka elektrona koriste se tzv. elektronske leće. One djeluju na snop elektrona pomoću električnog polja ili pomoću magnetskog polja pa se ovisno o tome nazivaju elektronskim ili magnetskim lećama.

Transmisijski elektronski mikroskop kao izvor svjetlosti ima tzv. elektronski top koji je građen od skupa elektroda (katoda i anoda) koje stvaraju snop elektrona, a razlika potencijala između katoda i anoda je između 20000 i 100000 volti. Udarima pozitivnih iona ili žarenjem volframove niti elektroni se izbijaju iz katode. Anoda je pozitivno nabijena elektroda koja privlači elektrone i propušta iste kroz središnji otvor. Ulogu kondenzora imaju elektronske leće koje sabiru snop elektrona na predmet koji promatramo. Nadalje, postoje elektronske leće koje imaju ulogu objektiva te stvaraju povećanu sliku promatranog predmeta. Ostale leće nazivaju se projekcione te povećavaju sliku objektiva i projiciraju istu na ekran ili fluorescentni zaslon. Dijelovi mikroskopa kroz koje prolazi snop elektrona moraju biti u vakuumu zbog utjecaja čestica zraka koje usporavaju ili zaustavljaju čestice elektrona. Konačna slika predmeta projicira se na zaslon prevučen fluorescentnim kemikalijama koje emitiraju svjetlost proporcionalno broju elektrona koji pada na njih (Atkins i sur. 2009). Naime snop elektrona prolazi kroz uzorak koji mora biti tanak i adekvatno pripremljen ili se raspršuje različitim smjerovima. Upravo je raspršenje snopa elektrona bitan faktor jer dijelovi uzorka veće gustoće ili debljine raspršuju više elektrona za razliku od dijelova manje gustoće ili debljine. Ta pojava omogućuje stvaranje kontrasta na elektronsko-mikroskopskoj slici.

Prednost TEM-a je u tome što je priprema uzoraka za mikroskopiranje nanočestica relativno jednostavna (Atkins i sur. 2009). Ta vrsta mikroskopije koristi se u prepoznavanju i kvantifikaciji elektronske strukture pojedinačnih nanokristala (Wang 1999). Transmisijaska elektronska mikroskopija je moćna i jedinstvena tehnika za strukturnu karakterizaciju

nanomaterijala (Wang 1999). Pomoću TEM-a moguće je detektirati i promjene u morfologiji na razini staničnih organela i locirati AgNP u biljnom tkivu. Nanočestice srebra su dovoljno velike da se pomoću TEM-a može promatrati njihov oblik i položaj na ultrastrukturnoj razini biljke te donositi zaključke o njihovoj lokalizaciji, agregaciji i raspadu.

1.5 Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES)

Atomska emisijska spektrometrija je metoda analitičke spektrometrije koja se koristi pretežno za kvantitativno određivanje sadržaja različitih elemenata u uzorcima. Metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) mogu se analizirati: biljni materijali, biološke otopine, tla, gnojiva, životinjska tkiva i namirnice. ICP-AES analiza omogućuje nam odrediti tragove srebra u biološkim uzorcima brzo i efikasno (Liu i sur. 2015)

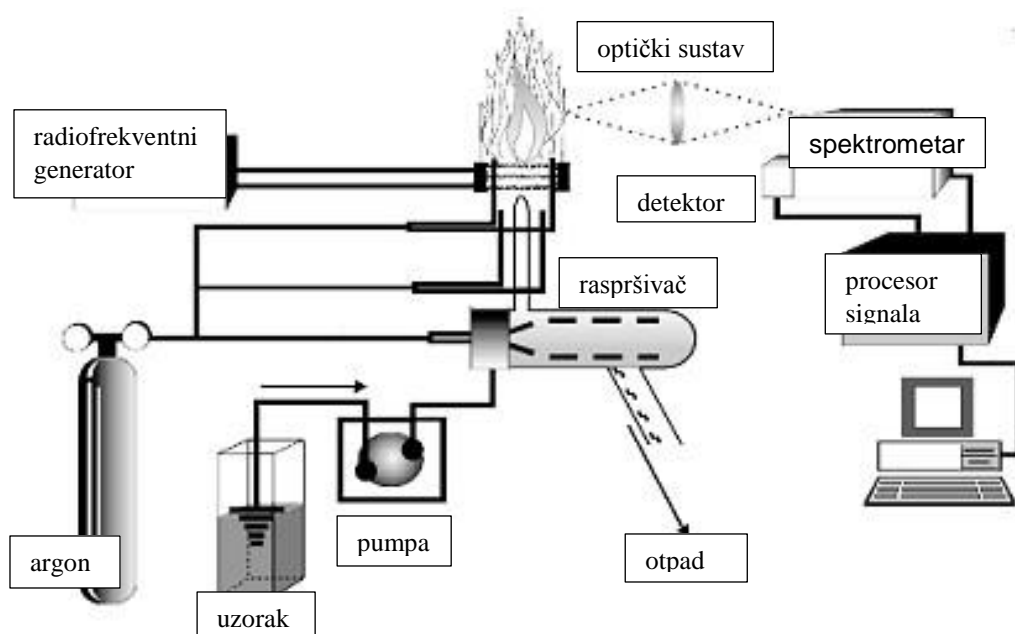
Princip atomske emisijske spektrometrije može se opisati kroz sljedeće korake: atomizaciju uzorka odnosno stvaranje slobodnih atoma i/ili iona, pobuđivanje i emisiju. Kod metode ICP-AES atomizacija uzorka se postiže pomoću plazma izvora. Plazma je visokoionizirani inertni plin velike elektronske gustoće i visoke temperature (oko 6000 K) pri kojoj dolazi do atomizacije i ekscitacije većine elemenata periodnog sustava (Holler i sur. 2007). Informacije o kemijskom sastavu uzorka dobivaju se iz atomskih spektara u optičkom dijelu elektromagnetskog spektra zračenja (emz). Ti atomski spektri nastaju kao posljedica povratka elektrona iz pobuđenog u osnovno stanje i emisije zračenja određene valne duljine. Naime, atom je nestabilan u pobuđenom stanju pa se vraća u osnovno stanje i pri tome emitira foton elektromagnetskog zračenja. Postoje situacije kada je apsorbirana energija velika pa elektron napušta atom i nastaje ionizacija.

Najčešće se primjenjuje argonova plazma u kojoj su ioni argona i elektroni osnovne vodljive kemijske vrste. Argon je inertan plin koji pripada u skupinu plemenitih plinova. Atomi svih plemenitih plinova imaju elektronske konfiguracije karakterizirane s popunjenim valentnim orbitalama (Filipović i Lipanović 1985). Nadalje ima visoku energiju ionizacije pa argonova plazma može pobuditi i ionizirati većinu elemenata.

Naime metodom ICP-AES mjeri se intenzitet zračenja pojedine spektralne linije (analitički signal). Intenzitet zračenja je pri tome proporcionalan koncentraciji elementa u uzorku, stoga metoda omogućuje kvantitativnu analizu kako pojedinačnih tako i višeelementnih sustava.

1.5.1 Opis rada instrumenta ICP-AES

Instrument ICP-AES sastoji se od sustava za uvođenje uzorka, plamenika, radiofrekvencijskog generatora i spektrometra. Shema emisijskog spektrometra uz induktivno spregnutu plazmu prikazana je na Slici 1. (Boss i sur. 1999).



Slika 1. Shema emisijskog spektrometra uz induktivno spregnutu plazmu (Boss i sur. 1999)

Za uvođenje uzorka u plazmu primjenjuje se:

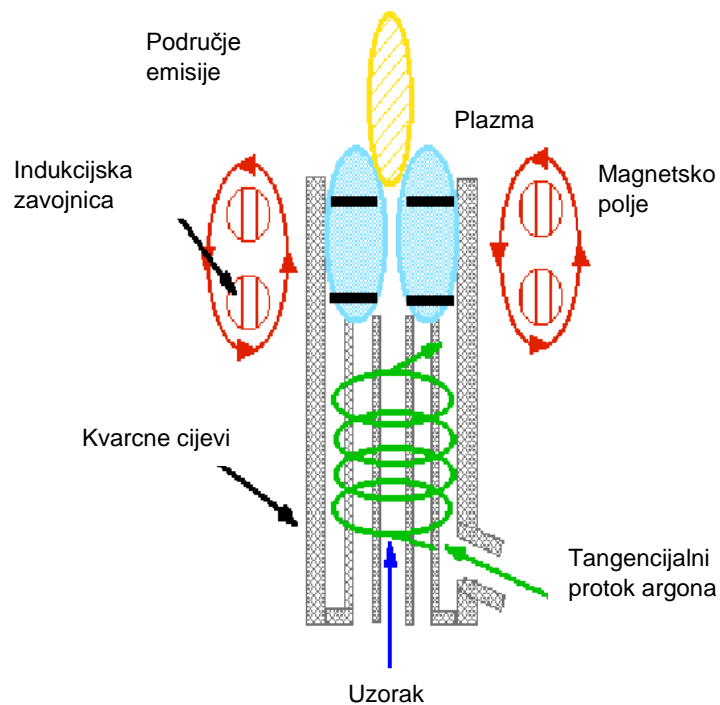
- Peristaltička pumpa koja služi za konstantni unos otopine uzorka u raspršivač.
- Raspršivač koji prevodi tekuće uzorke u aerosol koji se nakon toga prenosi u plazmu.
- Komora za raspršivanje koja služi za transport aerosola u plamenik. Glavna funkcija komore za raspršivanje je razvrstavanje čestica aerosola i uklanjanje velikih čestica aerosola.

Izvor zračenja sastoji se od:

- Plamenika koji se sastoji od tri koncentrične kvarcne cijevi (vanjska, središnja i unutarnja). Kroz vanjsku cijev argon protječe čineći stijenke plamenika hladnima. Kroz srednju cijev prolazi argon koji omogućava lakši dovod aerosola u plazmu. Vrh plamenika je omotan šupljom bakrenom zavojnicom. Slika 2. prikazuje shemu plamenika ICP-AES instrumenta. Zavojnica sadrži vodu ili zrak u unutrašnjosti koji služe za hlađenje. Zavojnica je povezana s radiofrekvencijskim generatorom čijim djelovanjem na zavojnicu dolazi do osciliranja izmjenične struje unutar zavojnice. Te

oscilacije unutar zavojnice generiraju magnetsko polje. Argon se uvodi u plamenik, a u radiofrekvencijskom polju u području zavojnice postaje električki vodljiv. Ionizacija argona počinje iskrom iz Tesline zavojnice.

- Radiofrekvencijskog generatora koji dovodi u zavojnicu izmjeničnu struju.



Slika 2. Shema plamenika ICP-AES instrumenta

Za sakupljanje i detekciju emitiranog zračenja primjenjuje se:

- Spektrometar, uređaj koji razdvaja polikromatsko zračenje na pojedinačne zrake određene valne duljine. Razdvajanje se postiže difrakcijskim rešetkama. Danas se često kao osnovni disperzijski element u spektrometru koristi ešeletna rešetka. Takvi spektrometri imaju bolju moć razlučivanja.
- Detektor, uređaj koji je fotoosjetljiv te apsorbira fotone i pretvara ih u električnu struju. Informacije o intenzitetu emisije zračenja mogu se dobiti mjerenje struje fotoelektrona.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Nanočestice srebra danas imaju mnogo primjena i prisutne su u mnogim komercijalno dostupnim proizvodima. Budući da se koriste u mnogim područjima ljudske djelatnosti, postavlja se pitanje sigurnosti njihove upotrebe za ekološke sustave i zdravlje ljudi. Biljke imaju značajnu ulogu u akumulaciji i bioraspodjeli mnogih ekoloških tvari te se smatra da bi mogle biti pod utjecajem AgNP i biti uključene u njihov transport i nagomilavanje u hranidbenim lancima. Uporaba poljoprivrednih proizvoda koji sadrže AgNP, kao što su umjetna gnojiva i pesticidi, već je na veliko započela i srebro je danas prihvaćen agrokemijski proizvod jer uklanja neželjene mikroorganizme u tlu i hidroponičkim sustavima. Upravo iz tog razloga nameće se pitanje na koji način ove čestice djeluju na biljni sustav odnosno koliko srebra akumuliraju biljke u svom tkivu. Također, pokazano je da AgNP nisu stabilne u eksperimentalnom mediju i da su sklone interakciji s komponentama u otopini u kojoj su izložene, što bi moglo utjecati na upotrebljivost te u konačnosti na toksičnost AgNP-a.

Stoga je cilj ovog istraživanja:

1. Utvrditi stupanj agregacije tri različito stabiliziranih nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) te iona srebra (AgNO_3) u hranidbenom mediju prije odnosno desetog dana tretmana klijanaca duhana.
2. Odrediti koncentraciju srebra u otopini (hranidbenom mediju) u kojoj je klijala biljka duhan (*Nicotiana tabacum* L.), zaostalom talogu u hranidbenom mediju te tkivu cijelih klijanaca duhana desetog dana tretmana nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) odnosno srebrovim nitratom.
3. Usporediti koncentraciju srebra u otopini, talogu i tkivu obzirom na vrstu omotača nanočestica.
4. Usporediti koncentraciju srebra u otopini, talogu i tkivu obzirom na primijenjenu koncentraciju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Nanočestice srebra

U ovom radu su, uz ionsko srebro (AgNO_3), korištene komercijalno proizvedene nanočestice srebra (AgNP), veličine 50 nm. Nanočestice srebra proizvodi nanoComposix tvrtka, San Diego, CA, SAD. Nanočestice su stabilizirane s tri vrste omotača: negativno nabijenim citratom, neutralnim polietilen glikolom (PEG) i pozitivno nabijenim, razgranatim polietileniminom (bPEI). Promjer i veličina čestica okarakterizirani su transmisijским elektronskim mikroskopom „JEOL 1010“. Masena koncentracija određena je instrumentom „Thermo Fisher X-Series 2 ICP-MS“. Karakterističan spektar određen je UV/VIS spektrofotometrom „Agilent 8453“, a zeta potencijal uređajem „Malvern Zetasizer Nano ZS“ (Prilog 1,2,3). Nadalje, za provjeru veličine, oblika i agregacije kupljenih nanočestica srebra korišten je transmisijский elektronski mikroskop FEI „Morgagni 268 D“.

3.1.2 Biljni materijal

Istraživanje za svoj diplomski rad provodila sam na biljci duhana (*Nicotiana tabacum* L.) sorte Berley. Sjemenke duhana dobivene su od Duhanskog instituta Zagreb d.o.o. Koristila sam sjemenke mase 0,050 g u svim tretmanima s nanočesticama srebra i ionskim srebrom kao i u kontrolnim uzorcima. Sjemenke sam najprije površinski sterilizirala u natrijevom hipokloritu (NaOCl) i autoklaviranoj destiliranoj vodi (deH_2O) u omjeru 1:1 (500 μL deH_2O i 500 μL NaOCl) nakon čega su 15 minuta inkubirane na tresilici (vorteks). Sjemenke sam potom pet puta isprala s deH_2O (1000 μL po ispiranju) u biljnom laminaru koristeći autoklavirane nastavke za mikropipete, pazeći da njima ne dotaknem nesterilni dio tubice. Sterilizirane sjemenke ostavila sam da odstoje do sljedećeg dana pri temperaturi 4 °C. Sjemenke su nakon sterilizacije podvrgnute mjerenju sadržaja srebra metodom ICP-AES kako bih utvrdila sadržje li same sjemenke srebro i u kojoj koncentraciji. Nadalje, sterilizirane sjemenke su podvrgnute tretmanu nanočesticama srebra, odnosno ionskim srebrom u modificiranom tekućem mediju (MS medij).

Sterilizirane sjemenke duhana isključavala sam u MS mediju u prisutnosti AgNP ili ionskog srebra određenih koncentracija (25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM) deset dana, pod kontrolnim uvjetima, u kulturi *in vitro*. Kontrolni uzorak predstavljale su sjemenke isključavane u MS mediju bez AgNP-a, odnosno AgNO_3 deset dana, pod kontrolnim uvjetima, u kulturi *in vitro*. Množinske koncentracije matične otopine AgNP-citrat iznosio je 194,68 μM , AgNP-PEG 185,4 μM , AgNP-bPEI 203,95 μM . Matičnu otopinu srebrovog nitrata

(AgNO₃) množinske koncentracije 10 mM, prije svakog tretmana svježe sam pripremila u ultračistoj vodi (miliQ)

3.1.3 Modificirani tekući medij

Sjemenke duhana su isklijavane u modificiranom, hranidbenom, tekućem MS mediju (Murashige i Skoog 1962), s polovičnom koncentracijom makroelemenata i autoklaviran. Sastav modificiranog hranidbenog medija Murashige i Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav modificiranog hranidbenog medija Murashige i Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata

Sastojci	Matična otopina	MS medij
MAKROELEMENTI		
KNO ₃ deH ₂ O	95 g Do 500 mL	5 mL
NH ₄ NO ₃ deH ₂ O	82,2 g Do 500 mL	5 mL
MgSO ₄ × 7 H ₂ O deH ₂ O	18,5 g Do 500 mL	5 mL
CaCl ₂ × 2 H ₂ O deH ₂ O	37,78 g Do 500 mL	5 mL
KH ₂ PO ₄ deH ₂ O	8,5 g Do 500 mL	5 mL
NaEDTA FeSO ₄ deH ₂ O	3,77 g 2,78 g Do 500 mL	2,5 mL
MIKROELEMENTI		
H ₃ BO ₃ MnSO ₄ × H ₂ O ZnSO ₄ × 7 H ₂ O KI	3,1 g 8,45 g 4,3 g 415 mg	1 mL

NaMoO ₄ × 2 H ₂ O	125 mg	
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	12,5 mg	
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	12,5 mg	
deH ₂ O	Do 500 mL	
VITAMINI		
B1 (tiamin)	10 mg	100 µL
deH ₂ O	Do 10 mL	
ORGANSKI ALKOHOL		
Myo-inozitol		0,10 g
SOLI		
MES [2-(N-morfolino)etanosulfonična kiselina]		0,50 g
ŠEĆER		
Saharoza		15 g
pH		5,9
deH ₂ O		Do 1 L

3.1.4 Kemikalije

Tijekom pripreme uzoraka, izvedbe mjerenja i pranja kemijskog posuđa korišteni su:

Dušična kiselina, HNO_3 (70 % v/v) Spectrapure, Merck, Njemačka

Dušična kiselina, HNO_3 (2 % v/v)

Vodikov peroksid, H_2O_2 , p.a., Kemika ($w = 30$ %)

ICP multielementni standard, Merck, $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$

Standardni referentni uzorak listova rajčice Tomato leaves (NIST-1573a)

Uzorak srebra, Ag (ICP standard), 1000 mg L^{-1}

Matične otopine: AgNP-citrat, $194,68 \mu\text{M}$, nanoComposix

AgNP-bPEI, $203,95 \mu\text{M}$, nanoComposix

AgNP-PEG, $185,4 \mu\text{M}$, nanoComposix

AgNO_3 , 10 mM, Sigma

Ultračista voda (miliQ), Merck Millipore $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$

Labaratorijsko posuđe prethodno je očišćeno dušičnom kiselinom, HNO_3 (10 % v/v)

3.2 METODE

3.2.1 Opis instrumenta

Za analizu sadržaja srebra korišten je Prodigy High Dispersive ICP spektrometar, Teledyne Leeman prikazan na Slici 3. Uvjeti rada instrumenta dani su u Tablici 3.



Slika 3. Emisijski spektrometar uz induktivno spregnutu plazmu

Tablica 3. Uvjeti rada ICP-AES spektrometra

Instrument	Prodigy High Dispersive ICP
Spektrometar	Ešeletni spektrometar visoke rezolucije
Raspršivač	Pneumatski
Komora za raspršivanje	Ciklonska komora
Položaj plazme	Aksijalni, radijalni
RF generator	40MH "free running"
Izlazna snaga	1,3 kW
Protok plina argona	vanjski: 18 L min ⁻¹ pomoćni: 0,8 L min ⁻¹ za raspršivanje: 1 L min ⁻¹
Peristaltička pumpa	0,9 mL min ⁻¹
Vrijeme unošenja uzorka	20 s

3.2.2 Provedba tretmana

Sterilizirane sjemenke duhana isključivala sam u modificiranom tekućem mediju (MS medij) u prisutnosti AgNP (AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG) ili ionskog srebra (AgNO_3) određenih koncentracija (25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM) deset dana, pod kontrolnim uvjetima, u kulturi *in vitro*. Za kontrolne uzorke, sjemenke sam isključivala u tekućem MS mediju bez AgNP-a, odnosno AgNO_3 deset dana, pod kontrolnim uvjetima, u kulturi *in vitro*.

Za provedbu tretmana i isključivanje klijanaca duhana koristila sam staklene Erlenmeyerove tikvice veličine 200 mL, pokrivene vatom i aluminijskom folijom te sterilizirane u autoklavu. Za provedbu tretmana koristila sam sterilizirano posuđe i pribor. Nakon što sam u biljnom laminaru otklopila sterilizirane Erlenmeyerove tikvice, dodala sam MS medij, a potom AgNP različitih omotača odnosno ionskog srebra prema Tablici 4 i na kraju sterilizirane sjemenke.

Tikvice sam poklopila pripadajućom vatom, nakon što sam vatu zapalila na plameniku te odmah poklopila pripadajućom aluminijskom folijom. Tako je rub tikvice ostao sterilan. Tikvice sa sjemenkama na tretmanu kao i kontrole odložila sam na miješalicu u klimakomori. Isključivanje klijanaca duhana trajalo je deset dana u uvjetima dugog dana (16 h osvjetljenje, 8 h mrak, 25 °C) i intenziteta svjetla 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tablica 4. Sastav otopina za isključivanje po tikvici

Tretman	Koncentracija (μM)	Volumen matične otopine AgNP (mL)	Volumen MS medija (mL)	Masa sjemenki duhana (g)
AgNP-citrat				
	25	0,642	4,358	0,05
	50	1,284	3,716	0,05
	75	1,926	3,074	0,05
	100	2,568	2,432	0,05
	125	3,210	1,790	0,05
	150	3,852	1,148	0,05
	0 (kontrola)	-	5	0,05
AgNP-bPEI				
	25	0,613	4,387	0,05
	50	1,226	3,774	0,05
	75	1,839	3,161	0,05
	100	2,452	2,548	0,05
	125	3,064	1,936	0,05
	150	3,677	1,323	0,05
	0 (kontrola)	-	5	0,05
AgNP-PEG				
	25	0.674	4.326	0,05
	50	1.348	3.652	0,05
	75	2.023	2.977	0,05
	100	2.700	2.300	0,05
	125	3.371	1.629	0,05
	150	4.045	0.955	0,05
	0 (kontrola)	-	5	0,05
AgNO₃				
	25	0,0125	4,988	0,05
	50	0,0250	4,975	0,05
	75	0,0375	4,963	0,05
	100	0,0500	4,950	0,05
	125	0,0625	4,938	0,05
	150	0,0750	4,925	0,05
	0 (kontrola)	-	5	0,05

3.3 Transmisijaska elektronska mikroskopija

3.3.1 Analiza agregacije nanočestica srebra u hranidbenom mediju prije i desetog dana tretmana klijanaca duhana

Analizirala sam agregaciju i veličinu tri različito stabiliziranih nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG) u hranidbenom mediju (MS medij) prije dodatka sjemenki duhana i desetog dana tretmana klijanaca duhana pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (model Morgagni 268D, FEI, Nizozemska) pri naponu od 70 kV.

Kako bih analizirala agregaciju i veličinu AgNP u MS mediju prije dodatka sjemenki duhana odnosno neposredno nakon dodatka AgNP u MS medij, pomiješala sam odgovarajuće volumene matičnih otopina nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNP-bPEI) i MS medija prema Tablici 4. kako bi dobila raspon koncentracija: 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M. Sjemenke duhana nisam dodala u ovako pripremljene otopine. Na bakrenu mrežicu presvučenu folijom formvar te naparenu ugljikom, kapnula sam 5 μ L ovako pripremljene otopine. Nakon što se uzorak osušio, prenijela sam mrežicu na nosač, a zatim u mikroskop. Uvjeti rada TEM-a su 110°C i visoki napon od 70 kV. Usljedila je analiza agregacije i veličine nanočestica srebra transmisijским elektronskim mikroskopom.

Kako bi analizirala agregaciju i veličinu AgNP u MS mediju desetog dana tretman klijanaca duhana, pomiješala sam MS medij s odgovarajućim volumenom matičnih otopina nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNP-bPEI) prema Tablici 4. kako bih dobila raspon koncentracija: 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M. U ovako pripremljene otopine dodala sam sjemenke duhana. Sjemenke duhana isključale su nakon 3 dana u male klijance pod kontroliranim uvjetima kulture *in vitro*. Biljčice su ostavljene još 7 dana na tretmanu. Desetog dana tretmana prenijela sam svu otopinu (mješavinu AgNP i MS medija) u kojoj su klijanci klijali i rasli u plastičnu epruvetu i ostavila da se istalože eventualni agregati AgNP-a. Na bakrenu mrežicu presvučenu folijom formvar te naparenu ugljikom, kapnula sam 5 μ L te otopine prenesene s dna plastične epruvete (talog). Nakon što se uzorak osušio, prenijela sam mrežicu na nosač, a zatim u mikroskop. Uvjeti rada TEM-a su 110°C i visoki napon od 70 kV. Usljedila je analiza agregacije i veličine nanočestica srebra transmisijским elektronskim mikroskopom.

3.3.2 Analiza agregacije ionskog srebra u hranidbenom mediju prije i desetog dana tretmana klijanaca duhana

Analizirala sam agregaciju i veličinu ionskog srebra kao vodenu otopinu srebrovog nitrata (AgNO_3) u hranidbenom mediju (MS medij) prije dodatka sjemenki duhana i desetog dana tretmana klijanaca duhana pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (model Morgagni 268D, FEI, Nizozemska) pri naponu od 70 kV.

Kako bih analizirala agregaciju i veličinu ionskog srebra u MS mediju prije dodatka sjemenki duhana odnosno neposredno nakon dodatka vodene otopine AgNO_3 u MS medij, pomiješala sam odgovarajući volumen matične otopine AgNO_3 i MS medija prema Tablici 4. kako bi dobila raspon koncentracija: 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM . Sjemenke duhana nisam dodala u ovako pripremljene otopine. Na bakrenu mrežicu presvučenu folijom formvar te naparenu ugljikom, kapnula sam 5 μL ovako pripremljene otopine. Nakon što se uzorak osušio, prenijela sam mrežicu na nosač, a zatim u mikroskop. Uvjeti rada TEM-a su 110°C i visoki napon od 70 kV. Uslijedila je analiza agregacije i veličine čestica srebra transmisijskim elektronskim mikroskopom.

Kako bih analizirala agregaciju i veličinu ionskog srebra u MS mediju desetog dana tretman klijanaca duhana, pomiješala sam MS medij s odgovarajućim volumenom matične otopine AgNO_3 prema Tablici 4. kako bi dobila raspon koncentracija: 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM . U ovako pripremljene otopine dodala sam sjemenke duhana. Sjemenke duhana isključale su nakon 3 dana u male klijance pod kontroliranim uvjetima kulture *in vitro*. Biljčice su ostavljene još 7 dana na tretmanu. Desetog dana tretmana prelija sam otopinu (mješavinu vodene otopine AgNO_3 i MS medija) u kojoj su klijanci klijali i rasli u plastičnu tubu i ostavila da se istalože eventualni agregati različitih specija srebra. Na bakrenu mrežicu presvučenu folijom formvar te naparenu ugljikom, kapnula sam 5 μL te otopine prenesene s dna plastične epruvete (talog). Nakon što se uzorak osušio, prenijela sam mrežicu na nosač, a zatim u mikroskop. Uvjeti rada TEM-a su 110°C i visoki napon od 70 kV. Uslijedila je analiza agregacije i veličine čestica srebra transmisijskim elektronskim mikroskopom.

3.4 Analiza srebra pomoću Prodigy High Dispersion ICP-AES spektrometra

3.4.1 Analiza koncentracije srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS mediju) i sjemenkama duhana

Analizirala sam koncentraciju srebra u tekućem hranidbenom mediju bez dodatka nanočestica i iona srebra te u sjemenkama duhana metodom ICP-AES. Budući da se tom metodom mjeri intenzitet zračenja pojedine spektralne linije, a nama treba informacija o koncentraciji srebra morala sam izraditi baždarnu (kalibracijsku) krivulju. Odnos intenziteta zračenja i koncentracije ne može se izračunati s dovoljnom točnošću pa se u praksi koristi empirijski utvrđen odnos između intenziteta emisije analita i njegove koncentracije u uzorku. Taj odnos opisuje kalibracijska krivulja.

Standardne otopine za izradu kalibracijske krivulje pripremila sam razrjeđenjem uzorka Ag (ICP standard, 1000 mg L⁻¹) s HNO₃ (2 % v/v) kako bi postigla sljedeće koncentracije: 0 mg L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹. Najprije sam pripremila matičnu otopinu čija je koncentracija 10 mg L⁻¹ tako da sam u odmjernu tikvicu od 10 mL dodala 100 µL uzorka Ag (ICP standard, 1000 mg L⁻¹) te dodala HNO₃ (2 % v/v) do oznake od 10 mL. Zatim sam iz te matične otopine priredila standardne otopine gore navedenih koncentracija što je prikazano u Tablici 5.

Tablica 5. Priprema standardnih otopina za kalibracijsku krivulju

c standardne otopine (mg L ⁻¹)	V (matične otopine) (mL)
0	-
0,1	0,1
0,5	0,5
1	1
5	5

MS medij pripremila sam za mjerenje tako da sam u staklene epruvete od 10 mL dodala 1 mL MS medija (Murashige i Skoog) i HNO₃ (70 % v/v) do oznake od 10 mL. Dakle, MS medij sam razrijedila deset puta zbog toga što sadrži određeni količinu saharoze koja može negativno utjecati na mjerni instrument.

Koncentraciju srebra u sjemenkama mjerila sam pomoću ICP-AES spektrometra. Sterilizirane sjemenke samljela sam u porculanskom tarioniku te izvagala na analitičkoj vagi. Za razaranje sjemenki korišteno je 5 mL HNO₃ (70 % v/v) i 2 mL H₂O₂ (w = 30 %), p.a. Nakon

što sam usipala smrvljene i izvagane sjemenke u teflonske boce, dodala sam 5 mL HNO_3 (70 % v/v) i ostavila u digestoru preko noći. Slijedeći dan u boce sa sjemenkama dodala sam još 2 mL H_2O_2 ($w = 30\%$), p.a. te boce prenijela u mikrovalnu te razarala tkivo pri uvjetima prikazanim u Tablici 10., poglavlje 3.5.3. Nakon što se uzorak sjemenki razorio i ohladio, sadržaj iz reakcijske boce prelila sam u odmjernu staklenu tikvicu od 25 mL. Isprala sam bocu za digestiju miliQ vodom, a zaostali sadržaj od ispiranja prelila u istu tikvicu. Sadržaj u tikvici nadopunila sam miliQ vodom do oznake 25 mL. Sadržaj iz tikvice profiltrirala sam kroz 0,45 μm filter (Whatman, Njemačka), u staklenu epruvetu kako bi eliminirala dijelove tkiva koji se nisu do kraja razorili.

3.4.2 Analiza koncentracije srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS mediju) u prisutnosti nanočestica i iona srebra

Analizirala sam koncentraciju srebra u tekućem hranidbenom mediju u prisutnosti nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) odnosno ionskog srebra (AgNO_3) prije dodavanja sjemenki duhana metodom ICP-AES. Tablice 6. i 7. prikazuju kako sam pripremila otopine za mjerenje.

Za mjerenje koncentracije srebra u MS mediju u prisutnosti AgNP, za svaku pojedinu koncentraciju (25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM) otopine, koristila sam po tri epruvete od 10 mL. U prvim epruvetama pomiješani su AgNP i MS medij prema Tablici 6. U drugoj epruveti jednak je omjer volumena AgNP-a i MS medija kao što je prikazano u Tablici 6. te je dodano 100 μL otopine 20 mg L^{-1} (ICP standard). U trećoj epruveti jednak je omjer volumena AgNP-a i MS medija kao što je prikazano u Tablici 6. te je dodano 200 μL otopine 20 mg L^{-1} (ICP standard). Metodu dodatka Ag (ICP standarda) koristila sam jer je sustav MS medija i AgNP-a sastavom složen te zbog same složenosti matrice. U sve epruvete dodana je još i HNO_3 (2 % v/v) do oznake od 10 mL. Tablica 8. prikazuje primjer pripreme otopine za mjerenje za koncentraciju 25 μM , a isti postupak, ali s različitim omjerima volumena MS medija i AgNP-a, provodila sam za sve ostale koncentracije.

Za mjerenje količine srebra u MS mediju u prisutnosti AgNO_3 , za svaku pojedinu koncentraciju (25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM) otopine, koristila sam po jednu epruvetu od 10 mL bez dodatka standarda Ag (Tablica 7). Za razliku od prethodno spomenutog sustava, sustav AgNO_3 je jednostavniji stoga ne zahtjeva dodatak ICP standarda Ag. U sve epruvete dodana je još i HNO_3 (2 % v/v) do oznake od 10 mL. Tablica 9. prikazuje primjer pripreme otopine za mjerenje za koncentraciju 25 μM , a isti postupak, ali s različitim omjerima volumena MS medija i AgNO_3 , provodila sam za sve ostale koncentracije.

Tablica 6. Prikaz primijenjenih volumena MS medija i volumena AgNP-citrat, $c=194,68 \mu\text{M}$, AgNP-bPEI $c=203,95 \mu\text{M}$, AgNP-PEG, $c=185,4 \mu\text{M}$ za pripremu otopine za mjerenje metodom ICP-AES

	AgNP-citrat		AgNP-bPEI		AgNP-PEG	
KONCENTRACIJA OTOPINE ZA MJERENJE (μM)	MS MEDIJ (μL)	Matična otopina AgNP-citrat (μL)	MS MEDIJ (μL)	Matična otopina AgNP-bPEI (μL)	MS MEDIJ (μL)	Matična otopina AgNP-PEG (μL)
25	436	64,2	439	61,3	433	6,4
50	372	128,4	377	123	365	135
75	307	192,6	316	184	298	202,3
100	243	257	255	245	230	270
125	179	321	194	306	163	337
150	115	385	132	368	96	405

Tablica 7. Prikaz primijenjenih volumena MS medija i volumena AgNO_3 , $c=1 \text{ mM}$, za pripremu otopine za mjerenje metodom ICP-AES

KONCENTRACIJA OTOPINE ZA MJERENJE (μM)	MS MEDIJ (μL)	matična otopina (AgNO_3) (μL)
25	0,5	0,0125
50	0,5	0,0250
75	0,5	0,0375
100	0,5	0,0500
125	0,5	0,0625
150	0,5	0,0750

Tablica 8. Primjer pripreme otopine (MS medij + AgNP-citrat) za mjerenje metodom ICP-AES, za koncentraciju 25 μM

1. epruveta	436 μL MS medij + 64,2 μL matične otopine AgNP-citrat		+ HNO_3 (2 % v/v) do 10 mL
2. epruveta	436 μL MS medij + 64,2 μL matične otopine AgNP-citrat	+ 100 μL Ag (ICP standard)	+ HNO_3 (2 % v/v) do 10 mL
3. epruveta	436 μL MS medij + 64,2 μL matične otopine AgNP-citrat	+ 200 μL Ag (ICP standard)	+ HNO_3 (2 % v/v) do 10 mL

Tablica 9. Primjer pripreme otopine (MS medij + AgNO_3) za mjerenje metodom ICP-AES, za koncentraciju 25 μM

1. epruveta	0,5 μL MS medij + 0,0125 μL matične otopine AgNO_3	+ HNO_3 (2 % v/v) do 10 mL
2. epruveta	0,5 μL MS medij + 0,0125 μL matične otopine AgNO_3	+ HNO_3 (2 % v/v) do 10 mL
3. epruveta	0,5 μL MS medij + 0,0125 μL matične otopine AgNO_3	+ HNO_3 (2 % v/v) do 10 mL

Standardne otopine za izradu kalibracijske krivulje pripremila sam razrjeđenjem uzorka Ag (ICP standard, 1000 mg L^{-1}) s HNO_3 (2 % v/v) kako bi postigla sljedeće koncentracije: 0 mg L^{-1} , 0,1 mg L^{-1} , 0,5 mg L^{-1} , 1 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , prema Tablici 5, poglavlje 3.4.1.

Za mjerenje sadržaja srebra koristila sam Prodigy High Dispersion ICP-AES spektrometar, Teledyne Leeman.

3.5 Analiza srebra desetog dana tretmana klijanaca duhana

3.5.1 Mjerenje koncentracije srebra u otopini desetog dana tretmana

Desetog dana tretmana mjerila sam koncentraciju srebra u otopini u kojoj su klijale sjemenke duhana u prisutnosti nanočesticama srebra odnosno ionskog srebra. Također, desetog dana, mjerila sam i koncentraciju srebra kontrolnog uzorka, odnosno otopine u kojoj su klijale sjemenke duhana bez prisutnosti nanočestica srebra odnosno ionskog srebra.

Najprije sam pripremila otopinu za mjerenje na način da sam otopinu u kojoj je klijala biljka (2-5 mL) prenijela u falcon epruvetu. Biljno tkivo u tikvici isprala sam tri puta s po 2 mL ultračiste vode. Otopinu zaostalu nakon ispiranja tkiva prenijela sam u istu, prethodno spomenutu falcon epruvetu. Sadržaj sam centrifugirala 10 minuta pri temperaturi 25 °C, i 4.000 x g (centrifuga Sigma 3K30, Sigma, Njemačka). Supernatant sam profiltrirala kroz 0,2 µm filtere (Sartorius, Njemačka) u staklenu epruvetu od 10 mL kako bi dobila podatak o koncentraciji slobodnih iona srebra u otopini. U filtrat sam dodala 200 µL HNO₃ (70 % v/v) i nadopunila do 10 mL miliQ vodom. Isti postupak provela sam za sve primijenjene koncentracije tretmana i njihove replike. Filtriranjem supernatanta, pokušala sam eliminirati sve moguće agregate čestica ili same čestice u nanoobliku prisutne u otopini MS medija, a koje se nisu istaložile prilikom centrifugiranja te dobiti podatke o koncentraciji slobodnih iona srebra u otopini.

Standardne otopine za izradu kalibracijske krivulje pripremila sam razrjeđenjem uzorka Ag (ICP standard, 1000 mg L⁻¹) s HNO₃ (2 % v/v) kako bi postigla sljedeće koncentracije: 0 mg L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹ prema Tablici 5, poglavlje 3.4.1.

Uslijedilo je mjerenje sadržaja srebra kao i u prethodnim fazama. Koncentraciju srebra u otopini izračunala obzirom na prethodno razrjeđenje.

3.5.2 Mjerenje koncentracije srebra u zaostalom talogu desetog dana tretmana

Desetog dana tretmana mjerila sam koncentraciju srebra u zaostalom talogu u MS mediju u kojem su klijale sjemenke duhana u prisutnosti nanočestica srebra odnosno ionskog srebra. Također, desetog dana mjerila sam i koncentraciju srebra kontrolnog uzorka, odnosno zaostalog taloga u MS mediju u kojem su klijale sjemenke duhana bez nanočestica srebra odnosno ionskog srebra.

Nakon što sam sakupila sav MS medij iz tikvica te ga centrifugirala (pojašnjeno u poglavlju 3.5.1) dobila sam talog. Na talog sam dodala 0,5 mL HNO₃ (70 % v/v). Pričekala sam

nekoliko minuta da se istalože grubi ostatci koji se nisu uspjeli otopiti i dolila ultračiste vode do oznake od 10 mL.

Standardne otopine za izradu kalibracijske krivulje pripremila sam razrjeđenjem uzorka Ag (ICP standard, 1000 mg L⁻¹) s HNO₃ (2 % v/v) kako bi postigla sljedeće koncentracije: 0, 0,1 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹ prema Tablici 5, poglavlje 3.4.1. te je uslijedilo je mjerenje.

Koncentraciju srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju izračunala sam obzirom na prethodno razrjeđenje uzorka.

3.5.3 Mjerenje koncentracije srebra u tkivu klijanaca duhana desetog dana tretmana

Desetog dana tretmana mjerila sam koncentraciju srebra u tkivu klijanca duhana koji su klijali u prisutnosti nanočestica srebra odnosno ionskog srebra. Također, desetog dana mjerila sam i koncentraciju srebra kontrolnog uzorka, odnosno u tkivu cijelih klijanaca duhana koji su klijali bez prisutnosti nanočestica srebra odnosno ionskog srebra.

Pripremila sam tkivo za mjerenje na sljedeći način: prebacila sam klijance na papirnati ručnik kako bi upio višak vode te sam tkivo klijanaca prenijela na satno staklo i sušila u sušioniku četiri sata pri 110 °C. Osušeno tkivo samljela sam u porculanskom tarioniku i izvagala na analitičkoj vagi te usula u reakcijske boce za digestiju tkiva. Uslijedio je postupak za mikrovalno potpomognuto razaranje biljnog tkiva u tri koraka.

Za mikrovalno potpomognuto razaranje uzoraka tkiva duhana korišten je uređaj MWS-2 Microwave System Speedware Berghof prema programu prikazanom u Tablici 10.

Tablica 10. Uvjeti za mikrovalno razaranje

Korak	Temperatura (min)	Vrijeme (min)	Snaga razgradnje (W)
1	90	20	60
2	130	10	60
3	100	10	60

Za razaranje biljnog materijala korišteno je 5 mL HNO₃ (70 % v/v) i 2 mL H₂O₂ (w = 30 %) p.a. Nakon što sam usipala smrvljeni i izvagani suhi biljni materijal u teflonske boce, dodala sam 5 mL HNO₃ (70 % v/v) i ostavila u digestoru preko noći. Naredni dan u boce s biljnim

materijalom dodala sam još 2 mL H₂O₂ (*w* = 30 %) p.a. , boce prenijela u mikrovalnu te razarala tkivo pri uvjetima prikazanim u Tablici 10. Mikrovalno potpomognutim razaranjem organska tvar prisutna u tkivu biljke razara se pri čemu se smanjuju interferencije kod ICP-AES mjerenja. Dušična kiselina razara ugljikovodike na vodu i ugljikov dioksid, a vodikov peroksid se dodaje kako bi se smanjio tlak u reakcijskoj boci. Prije svakog razaranja tkiva reakcijske boce su isprane s HNO₃ (10 % v/v) i miliQ vodom. Reakcijske posude i čepovi izrađeni su od teflona.

Nakon što se uzorak razorio i ohladio, sadržaj iz reakcijske boce prelila sam u odmjernu staklenu tikvicu od 25 mL. Isprala sam bocu za digestiju ultračistom vodom, a zaostali sadržaj od ispiranja prelila u istu tikvicu. Sadržaj u tikvici nadopunila sam ultračistom vodom do oznake 25 mL. Sadržaj iz tikvice profiltrirala sam kroz 0,45 µm filtere (Whatman, Njemačka) u staklenu epruvetu kako bi eliminirala dijelove tkiva koji se nisu do kraja razorili.

Standardne otopine za izradu kalibracijske krivulje pripremila sam razrjeđenjem uzorka Ag (ICP standard, 1000 mg L⁻¹) s HNO₃ (2 % v/v) kako bi postigla sljedeće koncentracije: 0 mg L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ prema Tablici 5, poglavlje 3.4.1.

Uslijedila je analiza sadržaja srebra metodom ICP-AES.

Koncentraciju srebra u tkivu klijanaca izračunala sam pomoću formule:

$$\text{Koncentracija srebra u tkivu} = \frac{X \cdot 25 \text{ mL}}{m \text{ (osušenog tkiva)}}$$

Gdje je:

X = izmjerena vrijednost ICP-AES metodom

m = masa osušenog tkiva u g

Koncentracija srebra u tkivu izražena je u µg g⁻¹.

Od izračunate koncentracije srebra u tkivu oduzela sam srednju vrijednost koncentracija srebra izmjerenih u kontrolnim uzorcima kako bih dobila realnu vrijednost koncentracije srebra u tkivu klijanaca duhana.

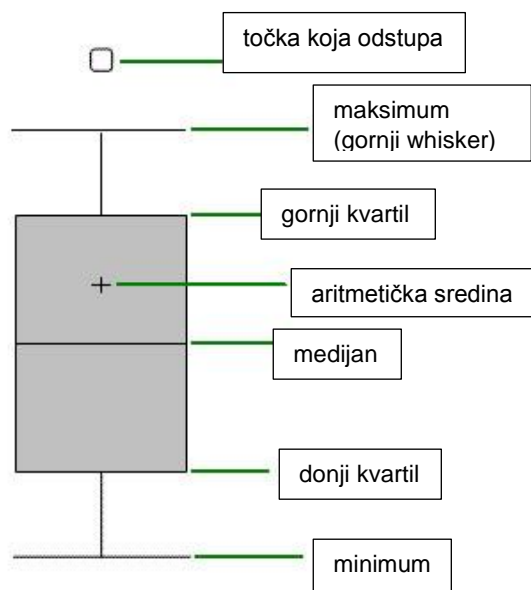
3.6 Validacija metode ICP-AES

Detekcijske granice (eng. Limit of Detection -LOD) razlikuju se ovisno o tipu izvora plazme, raspršivaču, spektrometru i vrsti uzorka, a za određene analite raspon vrijednosti je od 0,1 do 1000 mg L⁻¹ u vodenim otopinama. One predstavljaju najmanju količinu analita koja se u ispitivanom uzorku može detektirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Granica detekcije za sva mjerenja (otopina, talog, tkivo) iznosi 1,5 ng g⁻¹.

Koeficijent korelacije (R²) za sva mjerenja bio je > 0,9995.

3.7 Statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni analizom sadržaja srebra u otopini, talogu i tkivu klijanaca duhana podvrgnuti su statističkoj obradi podataka. Stoga sam koristila metodu Box-plot gdje su rezultati prikazani dijagramom s pravokutnikom (eng. box and whisker plot). Box-plot se sastoji od pravokutnika koji prikazuje podatke od donjeg do gornjeg kvartila, a kvartili predstavljaju mjeru raspršenosti. To je jednostavan grafički prikaz rezultata kojim se očitava medijan i raspon vrijednosti varijable. Naime, medijan predstavlja sredinu distribucije, odnosno pola vrijednosti skupa, a prikazan je crtom u pravokutniku. Označuje da je pola vrijednosti skupa iznad medijana, a pola vrijednosti skupa ispod medijana. Donje i gornje horizontalne linije (eng. whisker), različito se definiraju. Najčešće predstavljaju najmanji i najveći podatak koji se nalazi unutar 1,5 puta interkvartilnog raspona gledajući od donjeg, odnosno gornjeg kvartila. Točke izvan te granice se prikazuju posebno i smatraju se vrijednostima koje odstupaju od očekivanih vrijednosti. Osim toga, izgled dijagrama Box-plot upućuje na stupanj asimetričnosti i raspršenosti. Slika 4. prikazuje dijagram Box-plot.



Slika 4. Box-plot dijagram

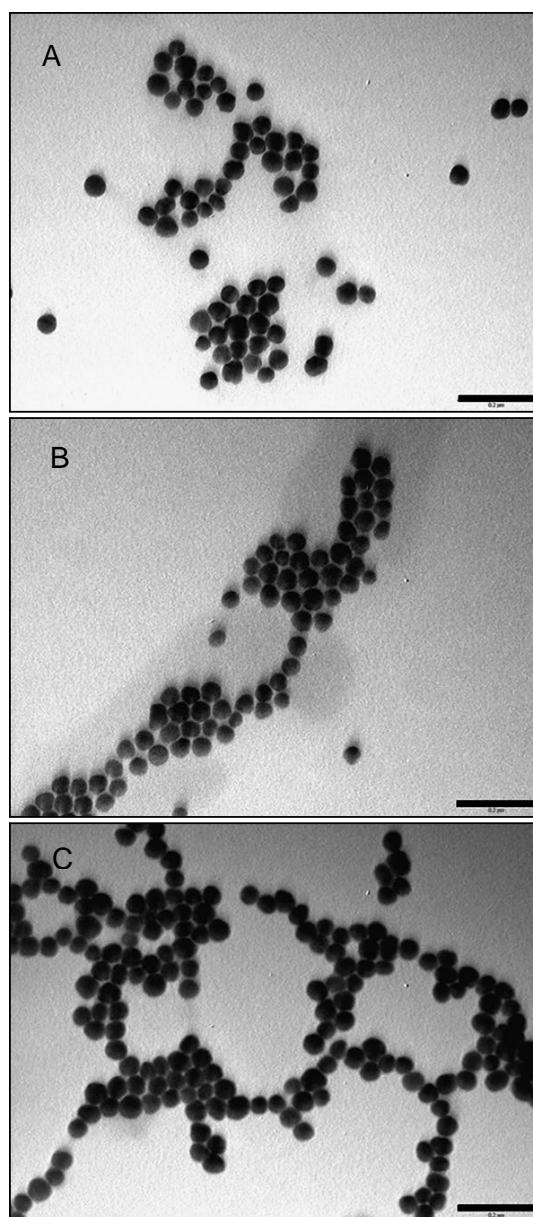
Kako bih utvrdila ima li statistički značajne razlike u koncentraciji srebra u otopini, talogu i tkivu klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃, podatke sam statistički obradila računalnim programom Statistica 13.1 (Stat Soft Inc., SAD) za analizu varijance (one-way ANOVA), nakon čega sam provela post-hoc Duncan test. Pri tumačenju statistički obrađenih rezultata značajnom sam smatrala razliku $p < 0,05$. Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost logaritma 10 \pm standardna devijacija od pet replika.

4. REZULTATI

4.1 Analiza nanočestica srebra transmisijском elektrоnskom mikroskopijom

4.1.1 Vizualizacija nanočestica srebra u matičnim otopinama

Komercijalno proizvedene nanočestice srebra korištene u ovom eksperimentalnom radu, vizualizirane transmisijском elektrоnskom mikroskopijom, su sferične i približno jednakih veličina, oko 50 nm, što prikazuje Slika 5. Osim toga, nanočestice srebra se pojavljuju pojedinačno ili u nakupinama.



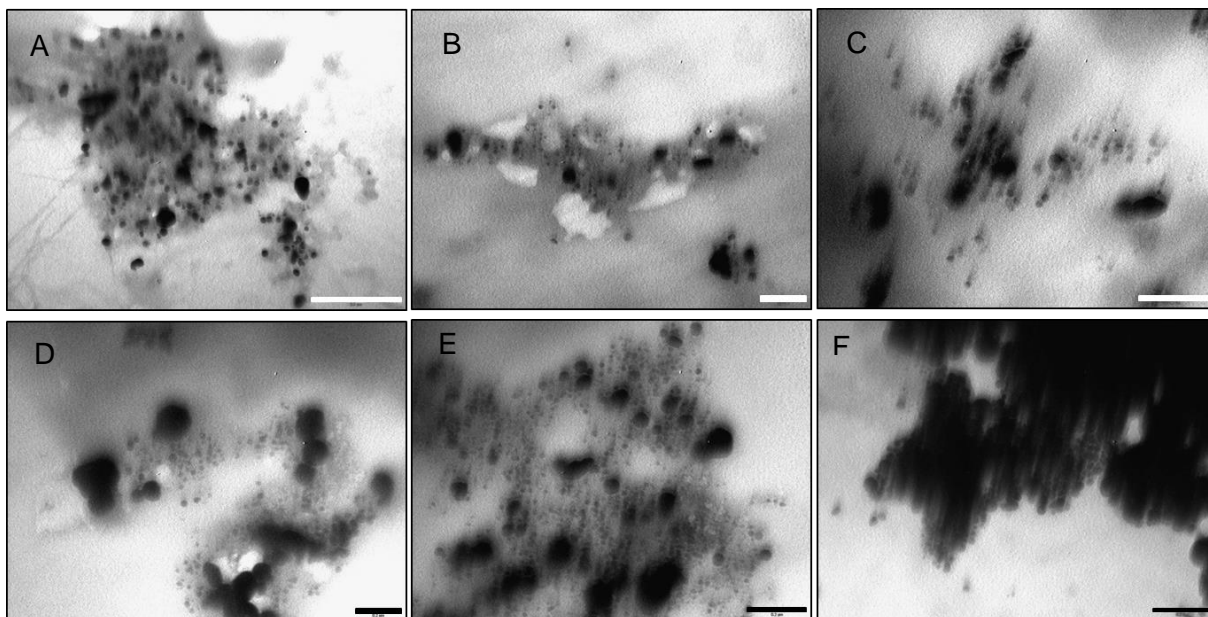
Slika 5. Nanočestice srebra pod transmisijским elektrоnskim mikroskopom. Matične otopine AgNP-citrat(A), AgNP-PEG (B), AgNP-bPEI (C). Mjerilo prikazuje 0,2 μm .

4.1.2 Vizualizacija i analiza nanočestica srebra u hranidbenom mediju prije i desetog dana tretmana klijanaca duhana

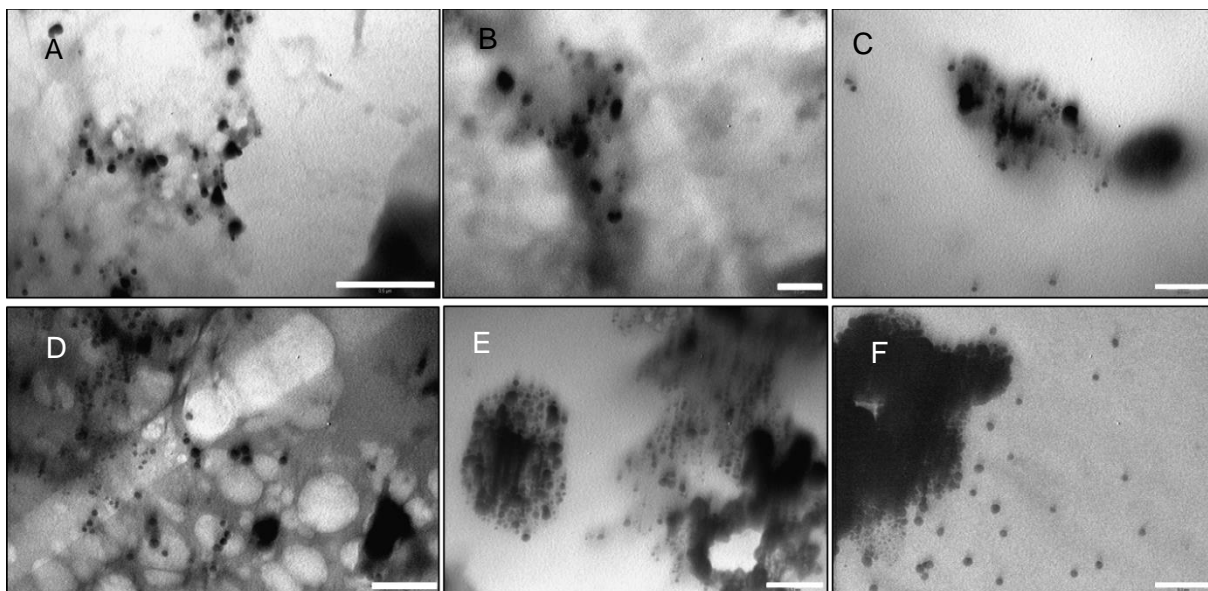
Analizirala sam agregaciju i veličinu nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG) u hranidbenom mediju (MS medij) prije dodatka sjemenki duhana i desetog dana tretmana klijanaca duhana pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa kako je opisano u poglavlju 3.3.1.

Nanočestice srebra u MS mediju prije dodatka sjemenki duhana odnosno neposredno nakon dodatka AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNP-bPEI u MS medij nisu pokazale znatno drugačiju sliku nego onu koja pokazuje AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNP-bPEI matičnih otopina (Slika 5). AgNP su i dalje bile sferične, približno jednakih veličina (50 nm) te su se pojavljivale pojedinačno ili u nakupinama i to u svim primijenjenim koncentracijama (25-150 μ M)

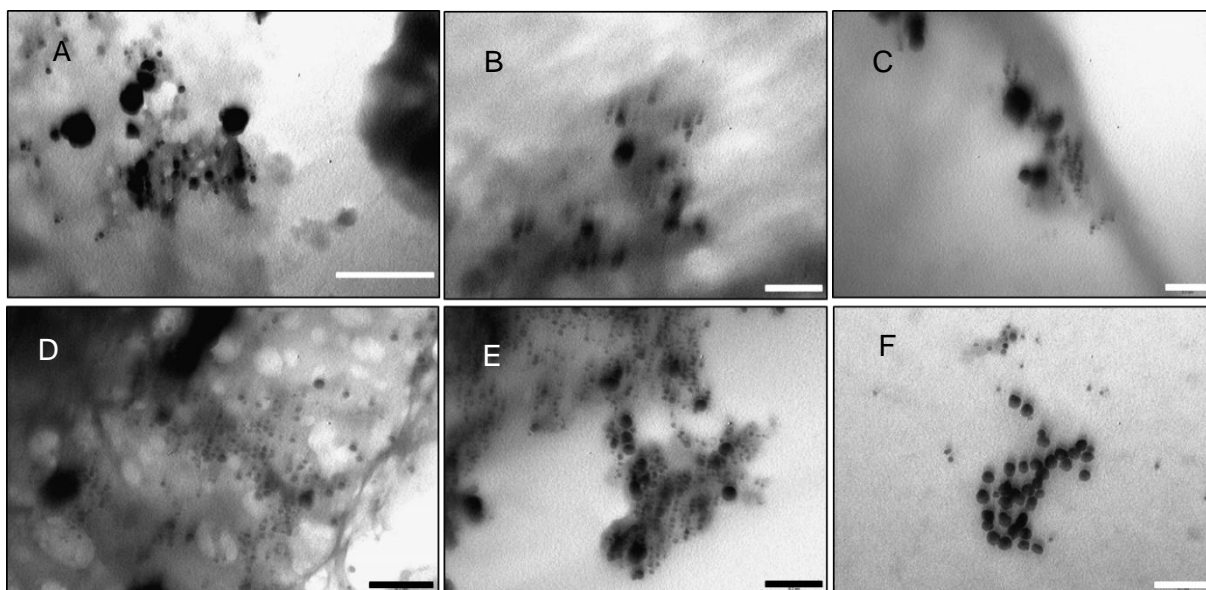
Nanočestice srebra u talogu hranidbenog medija desetog dana tretmana klijanaca duhana s AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNP-bPEI pri koncentracijama 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M su različite, uglavnom sfernog oblika, ali različitih veličina u odnosu na AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNP-bPEI u matičnim otopinama. Pojavljuju se pojedinačno ili u nakupinama te agregiraju, TEM snimke prikazuju AgNP-citrat (slika 6), AgNP-PEG (slika 7) i AgNP-bPEI (slika 8) u talogu hranidbenog medija desetog dana tretmana klijanaca duhana. Na TEM snimkama (slika 6 A, 7A i 8A) se može primijetiti da je promjena na svim ispitivanim AgNP već prisutna pri najnižoj primijenjenog koncentraciji (25 μ M) što se ponajviše očituje u veličini AgNP-a dok oblik uglavnom ostaje sferan. Rapon veličina za sve AgNP iznosi od 30-80 nm. Agregacija AgNP u MS mediju je pri koncentraciji 25 μ M (slika 6 A, 7A i 8A), 50 μ M (slika 6 B, 7B i 8B), 75 μ M (slika 6 C, 7C i 8C) i 100 μ M (slika 6 D, 7D i 8D) vrlo slična, a pojačana je pri višim koncentracijama AgNP-a (125 μ M i 150 μ M) i to prvenstveno kod AgNP-citrat (slika 6E i F) i AgNP-PEG (slika 7E i F). Kod AgNP-bPEI iako je agregacija prisutna nije toliko pojačana pri spomenutim koncentracijama (slika 8E i F).



Slika 6. Nanočestice srebra u talogu hranidbenog medija desetog dana tretmana klijanca duhana s AgNP-citrat pod transmisijskim elektronskim mikroskopom pri koncentracijama 25 μM (A) 50 μM (B) 75 μM (C) 100 μM (D) 125 μM (E) 150 μM (F). Mjerilo prikazuje 0,5 μm (A) i 0,2 μm (B, C, D E, F).



Slika 7. Nanočestice srebra u talogu hranidbenog medija desetog dana tretmana klijanca duhana s AgNP-PEG pod transmisijskim elektronskim mikroskopom pri koncentracijama 25 μM (A) 50 μM (B) 75 μM (C) 100 μM (D) 125 μM (E) 150 μM (F). Mjerilo prikazuje 0,5 μm (A) i 0,2 μm (B, C, D E, F).

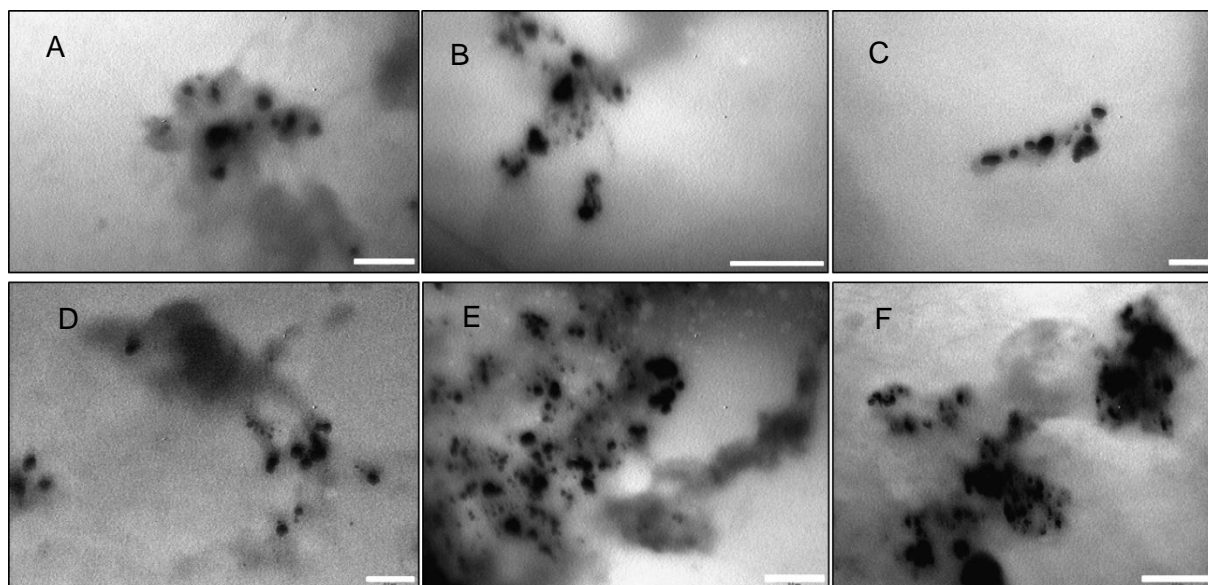


Slika 8. Nanočestice srebra u talogu hranidbenog medija desetog dana tretmana klijanca duhana s AgNP-bPEI pod transmisijskim elektronskim mikroskopom pri koncentracijama 25 μM (A) 50 μM (B) 75 μM (C) 100 μM (D) 125 μM (E) 150 μM (F). Mjerilo prikazuje 0,5 μm (A) i 0,2 μm (B, C, D E, F).

4.1.3 Vizualizacija i analiza ionskog srebra u hranidbenom mediju prije i desetog dana tretmana klijanaca duhana

Čestice srebra u MS mediju prije dodatka sjemenki duhana odnosno neposredno nakon miješanja vodene otopine srebrovog nitrata (matične otopine) i MS medija nisam uspjela vizualizirati niti u jednoj primijenjenoj koncentraciji (25 μM -150 μM). Zaključujem da je srebro u MS mediju i dalje bilo prisutno u ionskoj formi koju je nemoguće vizualizirati ovim modelom mikroskopa.

Naprotiv, na TEM snimkama (slika 9 A-F) se može primijetiti da je došlo do taloženja čestica srebra u hranidbenom mediju desetog dana tretmana klijanaca duhana s matičnom otopinom AgNO_3 pri koncentracijama 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM . Vidljivo je da su slobodni ioni srebra u vodenoj otopini srebrovog nitrata u MS mediju reagirali s komponentama MS medija te se istaložili u vidu specija srebra. Čestice srebra su uglavnom sfernog oblika, ali različitih veličina u rasponu od 20-120 nm. Pojavljuju se pojedinačno ili u nakupinama te agregiraju. Agregacija čestica srebra u MS mediju je pri koncentraciji 25 μM (slika 9 A), 50 μM (slika 9 B), 75 μM (slika 9C) i 100 μM (slika 9D) vrlo slična, a pojačana je pri višim koncentracijama: 125 μM (slika 9E) i 150 μM (slika 9F).



Slika 9. Čestice srebra u talogu hranidbenog medija desetog dana tretmana klijanca duhana s AgNO_3 pod transmisijskim elektronskim mikroskopom pri koncentracijama 25 μM (A) 50 μM (B) 75 μM (C) 100 μM (D) 125 μM (E) 150 μM (F). Mjerilo prikazuje 0,2 μm (A, C, D) i 0,5 μm (B, E, F).

4.2 Koncentracije srebra mjerene pomoću Prodigy High Dispersion ICP-AES spektrometra

4.2.1 Koncentracija srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS medij) i sjemenkama duhana

Analizirala sam koncentraciju srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS medij) bez dodatka nanočestica i iona srebra te u sjemenkama duhana metodom ICP-AES, kako je opisano u poglavlju 3.4.1.

Metodom ICP-AES izmjerena je zanemarivo mala koncentracija srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS mediju).

Naprotiv, sjemenke sadrže određenu koncentraciju srebra koja nije jednaka za sve sjemenke. Rezultati analize koncentracije srebra u sjemenkama duhana i standardnom referentnom uzorku listova rajčice (Tomato leaves (CRM)) prikazani su u Tablici 12. Vidljivo je da koncentracija srebra u referentnom uzorku (CRM) uvelike odskoče prilikom jednog mjerenja u odnosu na ostala mjerenja te iznosi 4,487 $\mu\text{g g}^{-1}$. Prilikom prvog mjerenja izmjerena je najviša koncentracija srebra u CRM i ona iznosi 14,29 $\mu\text{g g}^{-1}$ dok su prilikom drugog i trećeg mjerenja koncentracije srebra slične, oko 10 $\mu\text{g g}^{-1}$. Osim toga, u Tablici 11. je vidljivo da je raspon

koncentracija srebra u sjemenkama od 24,92 $\mu\text{g g}^{-1}$ do 54,65 $\mu\text{g g}^{-1}$ te da koncentracija srebra u sjemenkama varira.

Tablica 11. Rezultati analize koncentracije srebra u sjemenkama duhana sorte Barley i standardnom referentnom uzorku listova rajčice (Tomato leaves (CRM)).

Broj mjerenja	Koncentracija Ag u sjemenkama ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Koncentracija Ag u CRM ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	41,00	14,29
2	24,92	10,01
3	50,30	10,31
4	54,65	4,487

4.3 Koncentracija srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS mediju) u prisutnosti nanočestica i iona srebra

Analizirala sam koncentraciju srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS medij) u prisutnosti nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) odnosno ionskog srebra (AgNO_3) prije dodavanja sjemenki duhana metodom ICP-AES, kako je opisano u poglavlju 3.4.2.

Koncentracija srebra u MS mediju u prisutnosti AgNP-a odnosno AgNO_3 , bez dodatka sjemenki, raste kako raste primijenjena koncentracija AgNP-a odnosno AgNO_3 . Naime, pri primijenjenim koncentracijama od 25 μM do 150 μM očekivane, računske koncentracije srebra razlikuju se od izmjerenih koncentracija srebra. Tablica 12. prikazuje teorijski očekivane vrijednosti koncentracije srebra nakon primijenjenih koncentracija (od 25 μM do 150 μM) dok Tablica 13. prikazuje mjerene vrijednosti koncentracije srebra u MS mediju u prisutnosti nanočestica i iona srebra. Iz Tablice 12. i 13. je vidljivo da su izmjerene koncentracije srebra niže od očekivanih za sve primijenjene koncentracije (od 25 μM do 150 μM). Najveće odstupanje izmjerenih vrijednosti koncentracije srebra od izračunatih je pri 150 μM gdje je očekivana vrijednost 16,2 $\mu\text{g g}^{-1}$, a izmjerena vrijednost je za AgNP-citrat 6,9 $\mu\text{g g}^{-1}$, za AgNP-bPEI je 6,3 $\mu\text{g g}^{-1}$, za AgNP-PEG je 7,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ i za AgNO_3 je 8 $\mu\text{g g}^{-1}$. Naime, kada sam pomiješala MS medij s AgNP-citrat i AgNP-bPEI uočila sam promijene boje unutar 2 minute. Žuta boja otopine AgNP-citrat u MS mediju se promijenila u sivkastu te završetkom tretmana (10 dan) u bezbojnu. Žuta boja otopine AgNP-bPEI u MS mediju se promijenila u nježno ljubičastu te završetkom tretmana (10 dan) u bezbojnu. Žuta boja otopine AgNP-PEG u MS mediju je bila najstabilnija te se završetkom tretmana (10 dan) promijenila u bezbojnu. Prilikom miješanja matične otopine AgNO_3 i MS medija nisam primijetila da je došlo do promjene boje ili замуćenja otopine. Promjena boje upućuje na nestabilnost AgNP te na nastanak novih

kemijskih vrsta i njihovo moguće taloženje u eksperimentalnom sustavu. Dakle, dolazi do interakcije iona i nanočestica s kemijskim vrstama u MS mediju pa samim time i do odstupanja izmjerenih rezultata od očekivanih. Ako usporedimo rezultat koncentracije srebra u tekućem hranidbenom mediju (MS mediju) u prisutnosti iona srebra pri 25 μM s rezultatom koncentracije srebra u MS mediju u prisutnosti nanočestica (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) onda je koncentracija srebra u prisutnosti AgNO_3 niža od koncentracije srebra u prisutnosti AgNP-PEG, dok je približno jednaka koncentraciji u prisutnosti AgNP-bPEI i AgNP-citrat. Nadalje, pri 50 μM i 75 μM uočene su približno jednake koncentracije srebra u prisutnosti AgNP (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) i AgNO_3 . Pri 100 μM koncentracija srebra u prisutnosti AgNO_3 najbližija je koncentraciji srebra u prisutnosti AgNP-PEG te je viša od koncentracije srebra u prisutnosti AgNP-citrat i AgNP-bPEI. Pri 125 μM koncentracija srebra u prisutnosti AgNO_3 niža je od one u prisutnosti AgNP-PEG, a nešto malo viša od one u prisutnosti AgNP-citrat i AgNP-bPEI. Pri 150 μM koncentracija srebra u prisutnosti AgNO_3 je viša od one u prisutnosti AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG.

Tablica 12. Očekivane vrijednosti koncentracije srebra nakon primijenjenih koncentracija od 25 μM do 150 μM .

Primijenjena koncentracija (μM)	Izračunata očekivana koncentracija srebra (mg L^{-1})
25	2,7
50	5,4
75	8,1
100	10,8
125	13,5
150	16,2

Tablica 13. Koncentracija srebra u MS mediju u prisutnosti nanočestica i iona srebra

Tretman	Koncentracija (μM)	Koncentracija Ag u MS mediju (mg L^{-1})
AgNP-citrat		
	25	1,259
	50	2,451
	75	2,998
	100	4,779
	125	6,126
	150	6,908
AgNP-bPEI		
	25	1,198
	50	2,391
	75	3,966
	100	4,652
	125	6,042
	150	6,274
AgNP-PEG		
	25	1,433
	50	2,464
	75	3,628
	100	5,111
	125	7,189
	150	7,652
AgNO ₃		
	25	1,252
	50	2,496
	75	3,872
	100	5,363
	125	6,467
	150	7,999

4.4 Sadržaj srebra u kontrolnim uzorcima desetog dana isključivanja klijanaca duhana

Za svaku seriju tretmana AgNP (AGNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) i ionskim srebrom (AgNO₃) postavila sam i seriju kontrolnih uzoraka. Mjerenjem koncentracije srebra u otopini (MS medij) u kojoj su klijale sjemenke duhana bez prisutnosti AgNP i AgNO₃ (kontrolni uzorak) punih deset dana utvrdila sam da otopina ne sadrži srebro. Osim toga, mjerila sam koncentraciju srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju kontrolnog uzorka desetog dana isključivanja klijanaca i zaključila da talog ne sadrži srebro. Za svaku seriju tretmana AgNP (AGNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) i ionskim srebrom (AgNO₃) postavila sam i seriju klijanaca kontrolnih uzoraka koji su klijali u MS mediju, bez prisutnosti AgNP i AgNO₃. Nadalje, tkivo klijanaca kontrolnih uzoraka u seriji s AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNO₃ desetog dana isključivanja u MS mediju, sadrži određenu koncentraciju srebra dok u seriji s AgNP-bPEI

koncentracija srebra nije bila mjerljiva. Tablica 14. prikazuje rezultat analize koncentracije srebra u tkivu klijanaca kontrolnih uzoraka desetog dana isključavanja.

Tablica 14. Koncentracije srebra u tkivu klijanaca kontrolnih uzoraka desetog dana isključavanja klijanaca duhana

Replike	Koncentracija Ag u seriji mjerenja AgNP-citrat ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Koncentracija Ag u seriji mjerenja AgNP-bPEI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Koncentracija Ag u seriji mjerenja AgNP-PEG ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Koncentracija Ag u seriji mjerenja AgNO ₃ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
	tkivo	tkivo	tkivo	tkivo
K1	1,810	-	27,16	-
K2	2,212	-	7,83	3,714
K3	2,088	-	7,710	19,18
K4	-	-	2,606	18,72
K5	-	-	19,28	-

4.5 Statistička procjena kvalitete rezultata analize srebra desetog dana tretmana klijanaca duhana nanočesticama srebra i ionskim srebrom

4.5.1 Koncentracije srebra u otopini u kojoj su klijale sjemenke

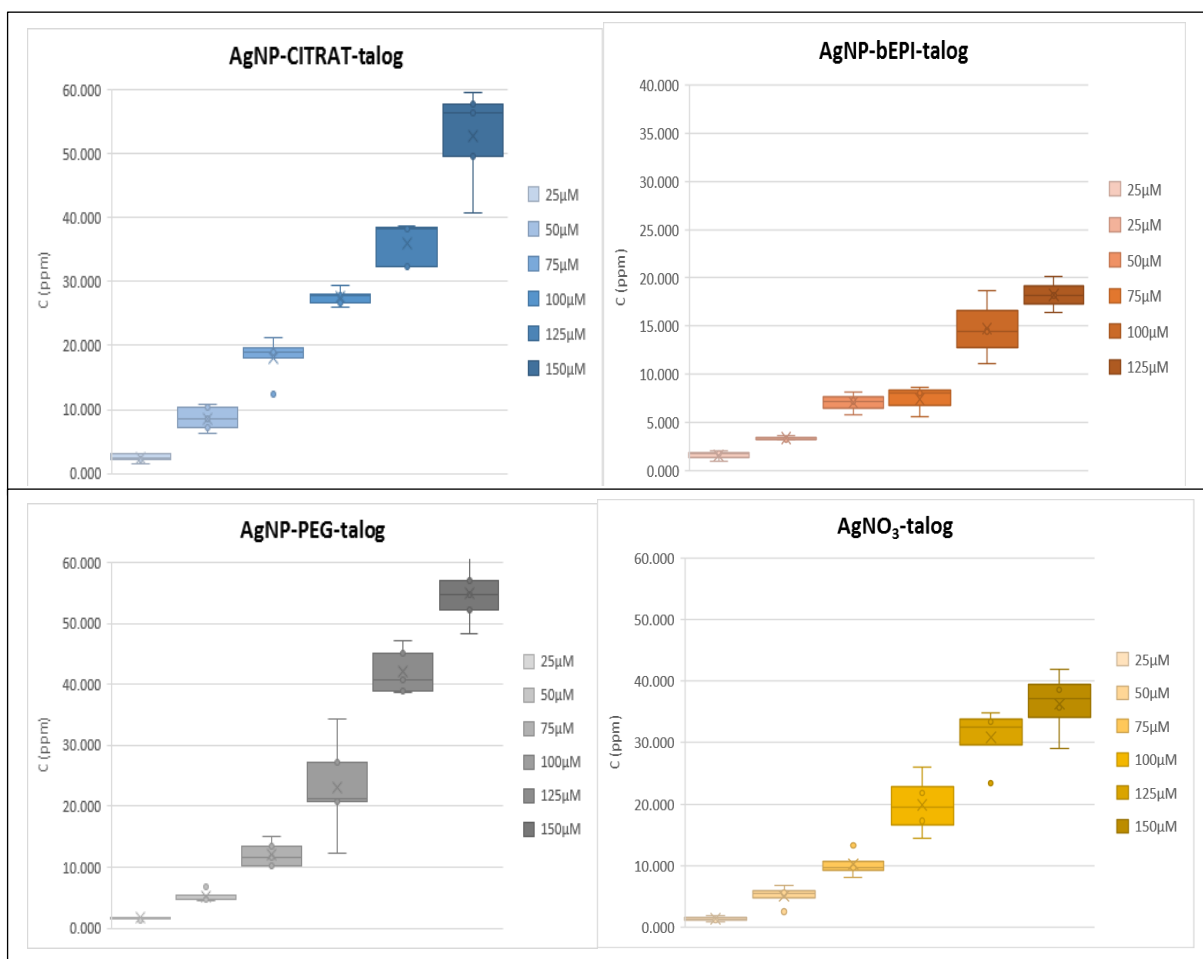
Dijagrami Box-plot prikazuju kvalitetu mjerne procedure koja uključuje pripremu uzoraka te mjerenje metodom ICP-AES. U okviru pojedinačnih koncentracija (25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM), za tretmane klijanaca AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃, nema znatnijih odstupanja. Unutar serije mjerenja za svaki pojedini tretman koncentracija srebra u otopini raste osim za tretmane AgNP-citratom pri 100 μM i AgNP-bPEI pri 100 μM gdje pada te za tretmane AgNP-PEG i AgNO₃ pri 125 μM gdje koncentracija srebra blago pada u odnosu na ostale primijenjene koncentracije. Takva odstupanja unutar serije mjerenja posljedica su efekta matrice. Slika 9. prikazuje Box-plot dijagram koncentracije srebra u otopini nakon desetog dana tretmana.



Slika 9. Box-plot dijagram koncentracija srebra u otopini u kojoj su klijale sjemenke duhana desetog dana tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃ pri koncentracijama 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM, 150 μM.

4.5.2 Koncentracije srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju

Kvaliteta mjerne procedure je viša pri nižim koncentracijama srebra nego pri višim koncentracijama srebra jer pri višim koncentracijama čestice agregiraju i dolazi do promjene u sustavu što se očituje u nižoj kvaliteti mjerne procedure. U okviru pojedinačnih koncentracija (25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM, 150 μM), za tretmane klijanaca AgNP-citratom, AgNP-bPEI-om, AgNP-PEG-om i AgNO₃, odstupaju koncentracije srebra za tretman AgNP-bPEI-om. Unutar serije mjerenja za svaki pojedini tretman koncentracija srebra u talogu u hranidbenom mediju raste porastom primijenjene koncentracije tretmana osim za tretman AgNP-bPEI gdje je pri 100 μM koncentracija srebra slična onoj pri tretmanu od 75 μM. Slika 10. prikazuje Box-plot dijagram koncentracije srebra u zaostalom talogu nakon desetog dana tretmana.

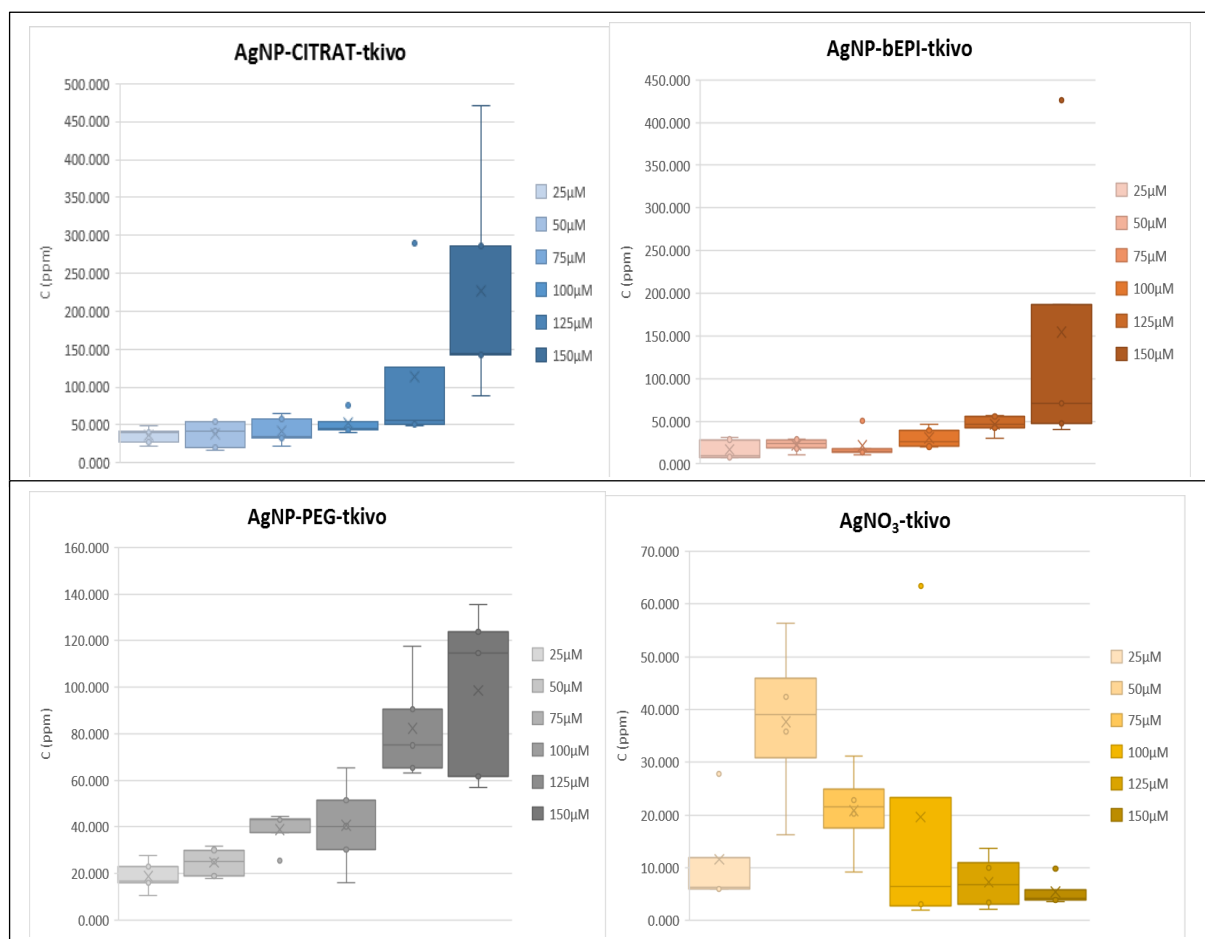


Slika 10. Box-plot dijagram koncentracija srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju desetog dana tretmana klijanaca duhana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃ pri koncentracijama 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM, 150 µM.

4.5.3 Sadržaj srebra u tkivu klijanaca duhana

Kvaliteta mjerne procedure pri mjerenju koncentracije srebra u tkivu klijanaca je viša pri nižim koncentracijama srebra nego pri višim koncentracijama srebra nakon tretmana s AgNP zbog agregacije AgNP-a pri višim koncentracijama. Međutim, nakon tretmana s AgNO₃ kvaliteta mjerne procedure je viša pri višim primijenjenim koncentracijama u odnosu na niže primijenjene koncentracije jer pri višim primijenjenim koncentracijama tkivo akumulira manju koncentraciju srebra te je manja agregacija čestica. Minimalan rast koncentracije srebra u klijancima za sve tretmane nanočesticama srebra, vidljiv je za primijenjene tretmane pri 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM. Dok je za iste tretmane pri 150 µM, vidljiv nagli skok koncentracije srebra. Međutim, nakon tretmana s AgNP-PEG vidljiv je skok u koncentraciji srebra u tkivu pri prijelazu s 50 µM na 75 µM te pri prijelazu s 100 µM na 125 µM.

Koncentracija srebra u klijancima duhana nakon tretmana s AgNO_3 opada gledajući primijenjene koncentracije od $50\ \mu\text{M}$ do $150\ \mu\text{M}$. Pri prijelazu s $25\ \mu\text{M}$ na $50\ \mu\text{M}$ vidljiv je skok u koncentraciji srebra nakon tretmana s AgNO_3 . Pri $150\ \mu\text{M}$ nakon tretmana s AgNO_3 izmjerena je niža koncentracija srebra u tkivu u odnosu na onu pri $25\ \mu\text{M}$. Slika 11. prikazuje Box-plot dijagram koncentracije srebra u tkivu klijanaca nakon desetog dana tretmana.



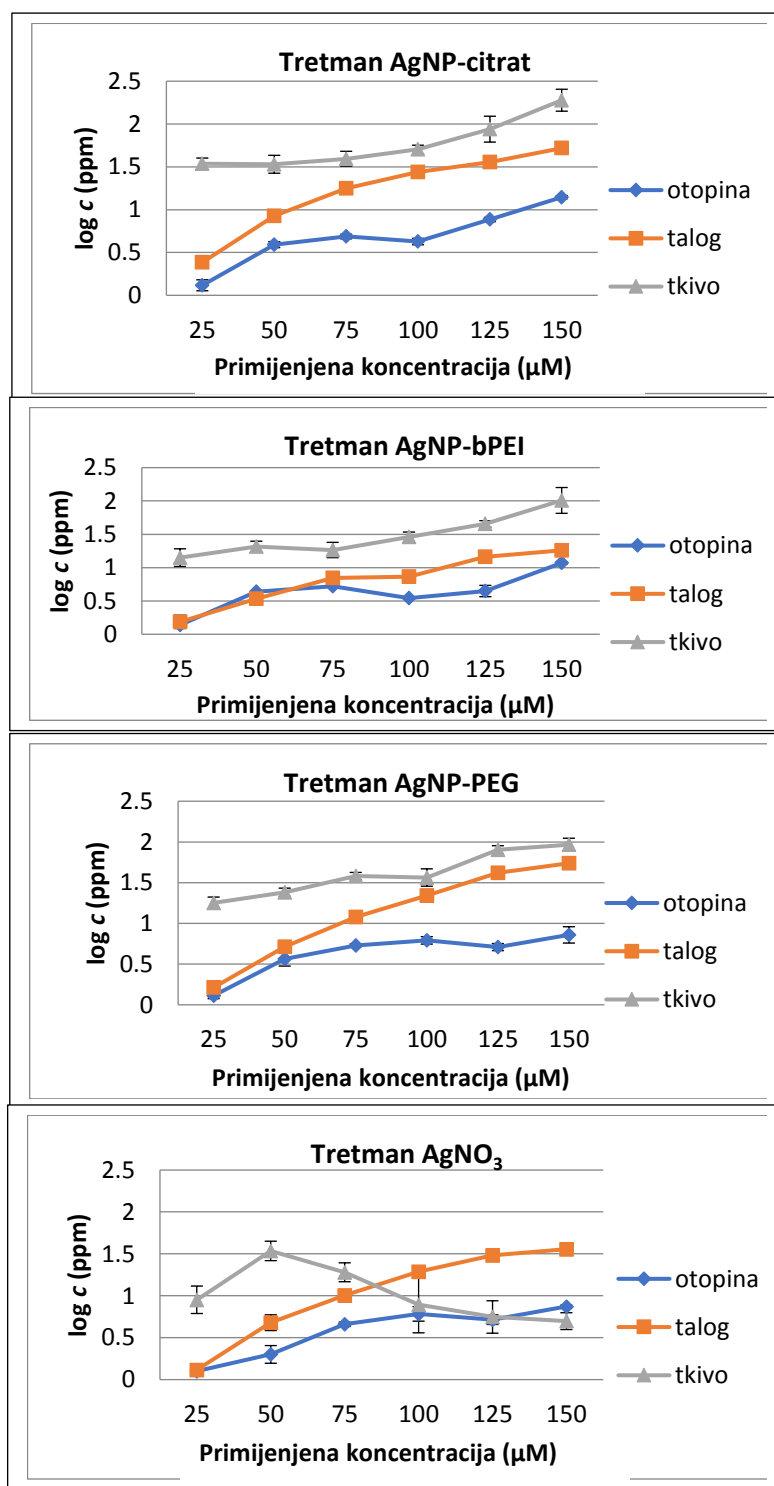
Slika 11. Box-plot dijagram koncentracija srebra u tkivu klijanaca duhana desetog dana tretmana klijanaca duhana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO_3 pri koncentracijama $25\ \mu\text{M}$, $50\ \mu\text{M}$, $75\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$, $125\ \mu\text{M}$, $150\ \mu\text{M}$

4.6 Analiza sadržaja srebra desetog dana tretmana klijanaca duhana

4.6.1 Raspodjela koncentracija srebra u sustavu otopine, taloga i tkiva klijanaca duhana

Rezultati analize koncentracije srebra u otopini u kojoj su klijale sjemenke, zaostalom talogu i tkivu klijanaca duhana tretiranih nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) i ionskim srebrom (AgNO_3) desetog dana tretmana, prikazani su na Slici 12. Dobiveni rezultati koncentracije srebra prevedeni su u logaritamske vrijednosti. Srednja vrijednost logaritmiranih koncentracija srebra prikazana je na osi ordinata, a na apscisi je prikazana koncentracija primijenjenih tretmana.

Gledajući odnos koncentracija srebra u otopini, talogu i tkivu, zapaženo je da se najveća koncentracija srebra akumulirala u tkivo nakon tretmana trima tipovima nanočestica srebra. Međutim, nakon tretmana ionskim srebrom koncentracija srebra u tkivu opada pri 50 μM da bi pri 150 μM bila manja od koncentracije srebra u otopini i zaostalom talogu nakon tretmana ionskim srebrom. Koncentracija srebra u talogu nakon tretmana nanočesticama (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) viša je od koncentracije srebra u otopini, ali niža od koncentracije srebra u tkivu, osim za tretman AgNP-bPEI pri 50 μM gdje je vidljivo da talog sadrži manju koncentraciju srebra od otopine. Nakon tretmana ionskim srebrom koncentracija srebra u talogu viša je od koncentracije srebra u otopini.



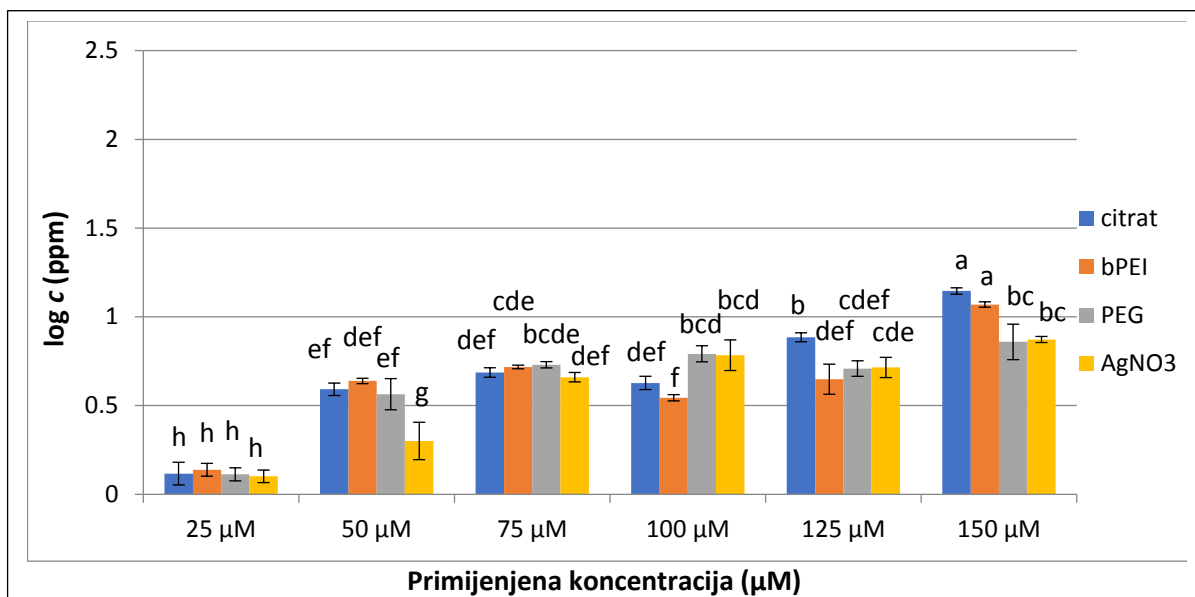
Slika 12. Raspon koncentracije srebra u otopini, talogu i tkivu klijanaca duhana desetog dana tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃ pri 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM, 150 μM. Rezultati predstavljaju logaritmirane vrijednosti koncentracija srebra ± standardna devijacija.

4.6.2 Raspon koncentracije srebra u otopini desetog dana tretmana nanočesticama srebra i ionskim srebrom

Rezultati analize koncentracije srebra u otopini u kojoj su klijale sjemenke tretirane nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) i ionskim srebrom (AgNO_3) desetog dana tretmana, prikazani su na Slici 13. Dobiveni rezultati koncentracije srebra su prevedeni u logaritamske vrijednosti koje su podvrgnute statističkoj analizi. Srednja vrijednost logaritmiranih koncentracija srebra prikazana je na osi ordinata dok je na apscisi prikazana koncentracija primijenjenih tretmana.

Pri koncentraciji 50 μM i 150 μM , u otopini je izmjerena statistički značajno povišena koncentracija srebra u odnosu na koncentraciju od 25 μM dok je pri koncentraciji 75 μM , 100 μM i 125 μM koncentracija srebra bila relativno ujednačena za sve tretmane. U otopini (25 μM) nakon tretmana sa sva tri tipa nanočestica te ionskim srebrom izmjerena je podjednaka količina srebra nakon svih tretmana. Pri koncentraciji od 50 μM nema statistički značajne razlike u koncentraciji srebra u otopini u prisutnosti sa sva tri tipa nanočestica, ali postoji statistički značajna razlika u koncentraciji srebra u otopini nakon tretmana ionskim srebrom gdje je koncentracija srebra niža u odnosu na AgNP. Pri koncentraciji od 75 μM nema statistički značajne razlike u koncentraciji srebra nakon svih provedenih tretmana. Pri koncentraciji od 100 μM statistički je niža koncentracija srebra u otopini nakon tretmana AgNP-bPEI i AgNP-citrat u odnosu na otopinu nakon tretmana AgNP-PEG i ionskim srebrom. Pri koncentraciji od 125 μM statistički je viša koncentracija srebra u otopini nakon tretmana AgNP-citrat u odnosu na ostale tretmane. Pri koncentraciji od 150 μM statistički je viša koncentracija srebra nakon tretmana AgNP-citrat i AgNP-bPEI u odnosu na AgNP-PEG i AgNO_3 .

Ako usporedimo koncentraciju srebra nakon tretmana svim tipovima nanočestica i onu nakon tretmana s AgNO_3 vidljivo je da je koncentracija srebra nakon tretmana s AgNO_3 pri 75 μM statistički jednaka koncentraciji srebra nakon tretmana AgNP-citrat. Pri 50 μM koncentracija srebra u otopini nakon tretmana s AgNO_3 statistički je niža u odnosu na tretmane s AgNP. Pri 100 μM i 150 μM koncentracija srebra nakon tretmana s AgNO_3 statistički je jednaka u odnosu na tretman AgNP-PEG.



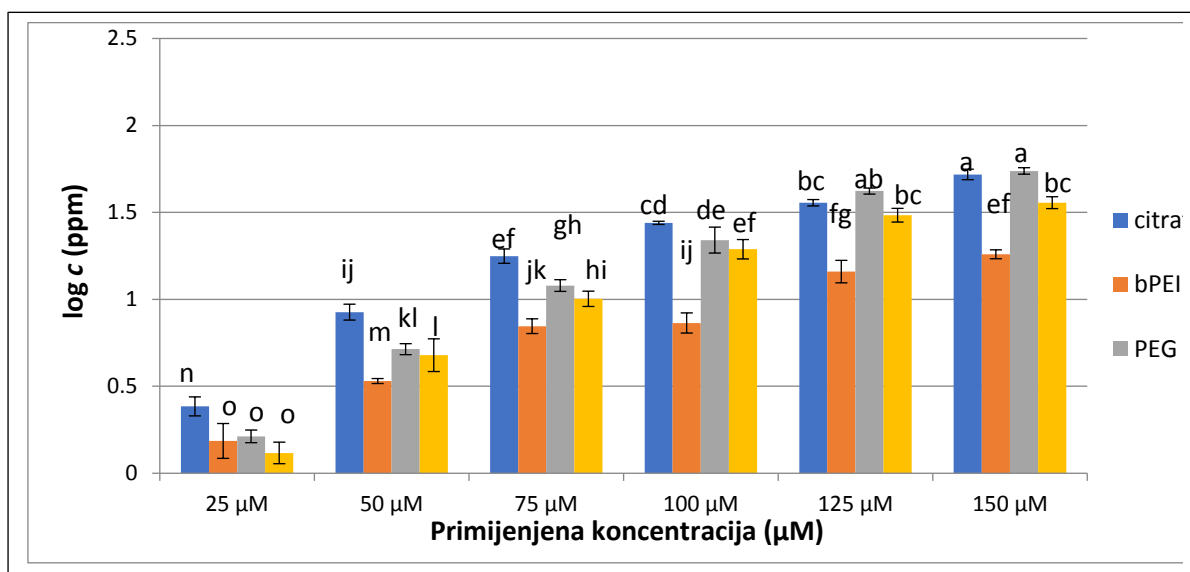
Slika 13. Raspon mjerenih koncentracija srebra u otopini desetog dana tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃, pri koncentracijama 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM i 150 µM. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti logaritmiranih koncentracija srebra ± standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ($p < 0.05$, Duncan test).

4.6.3 Raspon koncentracije srebra u sustavu zaostalog taloga desetog dana tretmana nanočesticama srebra i ionskim srebrom

Rezultati analize koncentracije srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju desetog dana tretmana nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) i ionskim srebrom (AgNO₃), prikazani su na Slici 14. Vidljivo je da koncentracija srebra linearno raste za svaki od tretmana, a nešto veći skok u koncentraciji srebra vidljiv je ako usporedimo primijenjene koncentracije od 25 µM i 50 µM. Pri 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM statistički je povećana koncentracija srebra nakon tretmana AgNP-citratom u odnosu na ostale tretmane. Pri 100 µM, 125 µM i 150 µM statistički je niža koncentracija srebra nakon tretmana AgNP-bPEI u odnosu na ostala tri tretmana. Osim toga, vidljivo je da je koncentracija srebra nakon tretmana AgNP-bPEI pri 50 µM, 75 µM niža u odnosu na koncentracije srebra nakon ostalih tretmana.

Pri 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM i 150 µM nakon tretmana s AgNO₃ primijetila sam da je koncentracija srebra viša od iste nakon tretmana AgNP-bPEI, a niža u odnosu na tretmane

AgNP-citrat i AgNP-PEG. Pri 25 μM koncentracija srebra nakon tretmana s AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃ statistički je jednaka te niža u odnosu na tretman AgNP-citrat.

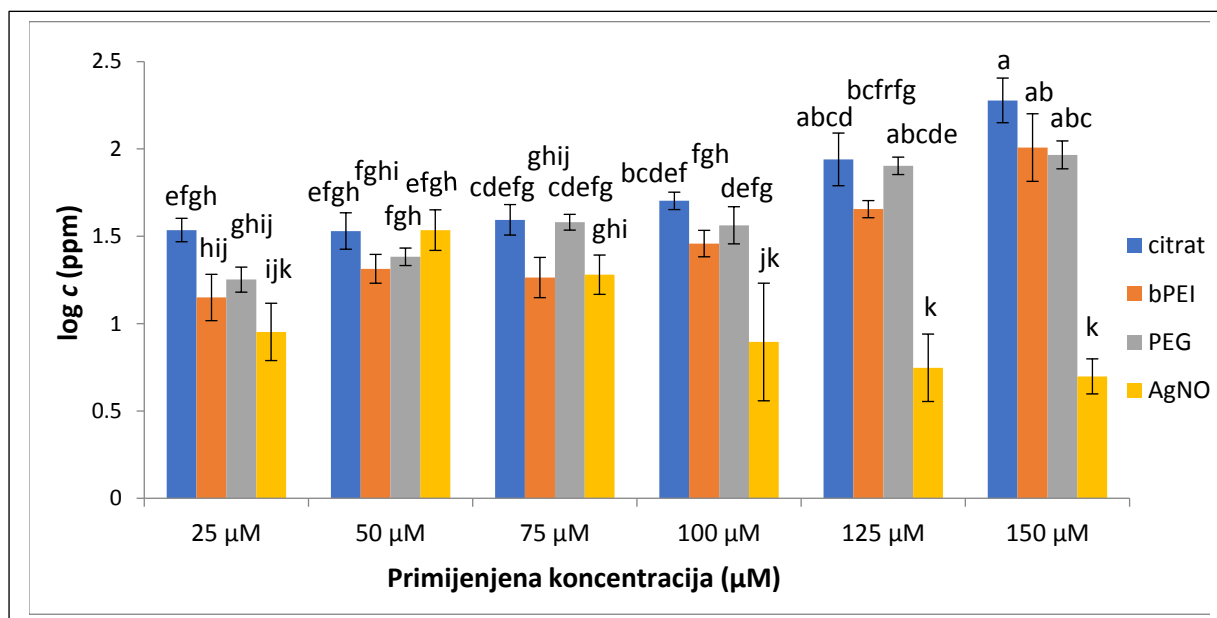


Slika 14. Raspon mjerenih koncentracija srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju desetog dana tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃, pri koncentracijama 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM i 150 μM . Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti logaritmiranih koncentracija srebra \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ($p < 0.05$, Duncan test).

4.6.4 Raspon koncentracije srebra u sustavu tkiva klijanaca desetog dana tretmana nanočesticama srebra i ionskim srebrom

Rezultati analize akumulacije srebra u tkivu klijanaca duhana desetog dana tretmana nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) i ionskim srebrom, prikazani su na Slici 15. Uočen je skok u količini akumuliranog srebra nakon tretmana AgNP (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) pri prijelazu s 125 μM na 150 μM . Pri 25 μM statistički viša koncentracija srebra zabilježena je nakon tretmana s AgNP-citrat u odnosu na tretmane AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃. Pri 50 μM , statistički niža koncentracija srebra izmjerena je nakon tretmana s AgNP-bPEI u odnosu na tretmane AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNO₃ dok je statistički jednaka koncentracija srebra izmjerena nakon tretmana AgNP-citrat i AgNO₃. Pri 75 μM statistički jednaka koncentracija srebra zabilježena je nakon tretmana AgNP-citrat i AgNP-PEG. Nadalje, pri 100 μM , 125 μM i 150 μM statistički najniža koncentracija srebra izmjerena

je nakon tretmana s AgNO_3 u odnosu na tretman s AgNP. Pri 150 μM statistički viša koncentracija srebra zabilježena je nakon tretmana s AgNP-citrat u odnosu na ostale tretmane, a statistički najniža koncentracija srebra izmjerena je nakon tretmana s AgNO_3 . Jedini porast akumulacije srebra u tkivu nakon tretmana s AgNO_3 vidljiv je na prijelazu s 25 μM na 50 μM .

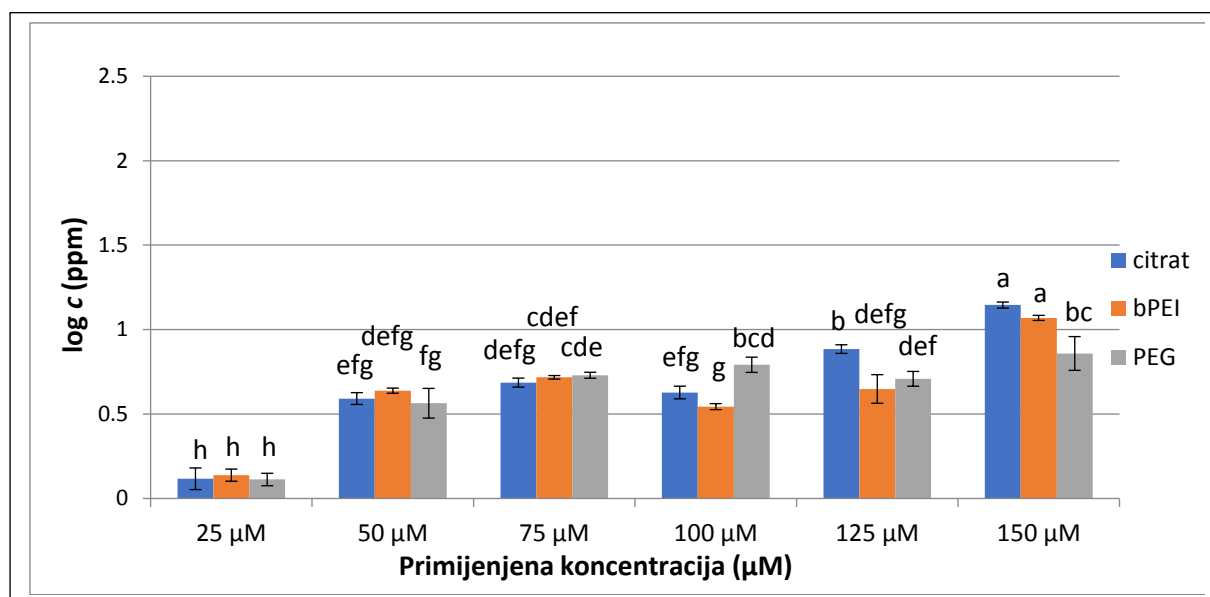


Slika 15. Raspon mjerenih koncentracija srebra u tkivu klijanaca desetog dana tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO_3 , pri koncentracijama 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM i 150 μM . Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti logaritmiranih koncentracija srebra \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ($p < 0.05$, Duncan test).

4.6.5 Raspon koncentracije srebra u sustavu otopine desetog dana tretmana nanočesticama srebra

Raspon koncentracije srebra u otopini u kojoj su klijale sjemenke tretirane nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) prikazan je na Slici 16. Uočeno je da pri 25 μM , 50 μM , 75 μM nema statistički značajne razlike u koncentraciji srebra nakon tretmana sa sva tri tipa nanočestica srebra. Međutim, pri 100 μM uočeno je da se koncentracija srebra u otopini statistički značajno razlikuje nakon tretmana sa sva tri tipa AgNP. Nadalje, pri 100 μM nakon tretmana AgNP-PEG uočena je statistički viša koncentracija srebra u odnosu na tretmane AgNP-citrat i AgNP-bPEI. Pri 125 μM zamijetila sam da je koncentracija srebra nakon tretmana AgNP-citrat statistički viša u odnosu na tretmane AgNP-bPEI i AgNP-PEG. Pri

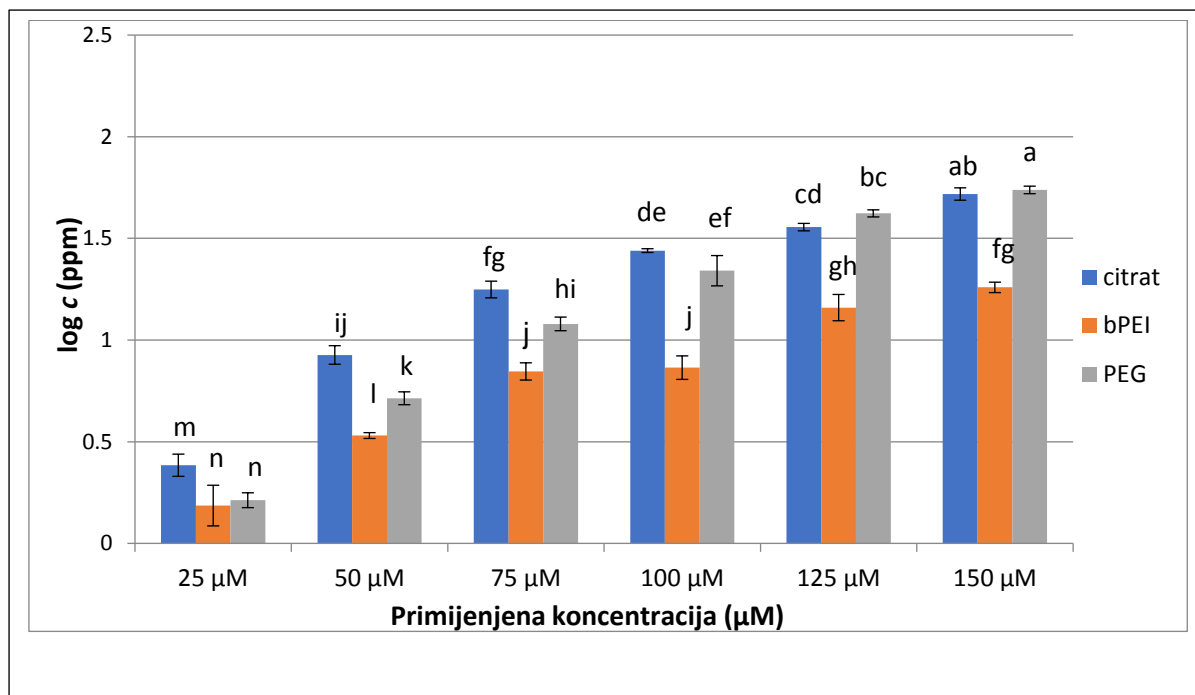
150 μM koncentracija srebra nakon tretmana AgNP-PEG bila je statistički niža u odnosu na tretmane AgNP-citrat i AgNP-bPEI.



Slika 16. Raspon mjerenih koncentracija srebra u otopini klijanaca desetog dana tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG pri koncentracijama 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM i 150 μM . Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti logaritmiranih koncentracija srebra \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ($p < 0.05$, Duncan test).

4.6.6 Raspon koncentracije srebra u sustavu zaostalog taloga desetog dana tretmana nanočesticama srebra

Raspodjela sadržaja srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju desetog dana tretmana nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG), prikazan je na Slici 17. Statistički značajan porast koncentracije srebra zapažen je pri prijelazu s 25 μM na 50 μM te pri prijelazu s 50 μM na 75 μM . Pri 25 μM statistički je viša koncentracija srebra nakon tretmana AgNP-citrat u odnosu na tretman AgNP-bPEI, AgNP-PEG. Dok je pri 50 μM i 75 μM uočeno da se koncentracija srebra statistički razlikuje nakon tretmana trima vrstama nanočestica srebra gdje je najviša kod AgNP-citrat, a najniža kod AgNP-bPEI. Pri 100 μM , 125 μM , 150 μM koncentracija srebra u talogu statistički je niža nakon tretmana AgNP-bPEI u odnosu na tretmane AgNP-citrat i AgNP-PEG koji daju slične rezultate.



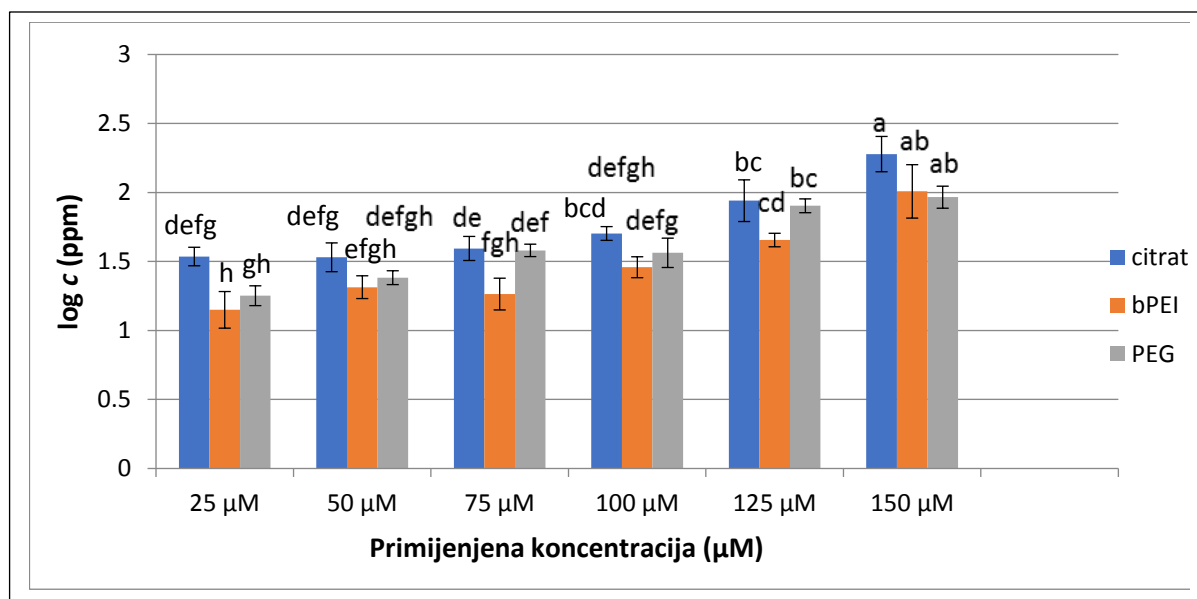
Slika 17. Raspon mjerenih koncentracija srebra u zaostalom talogu desetog dana tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG pri koncentracijama 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM i 150 µM. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti logaritmiranih koncentracija srebra \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ($p < 0.05$, Duncan test).

4.6.7 Raspon koncentracije srebra u sustavu tkiva klijanaca desetog dana tretmana nanočesticama srebra

Raspon koncentracije srebra desetog dana tretmana nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) prikazan je na Slici 18. Pri 25 µM statistički viša koncentracija srebra zabilježena je nakon tretmana s AgNP-citrat u odnosu na AgNP-bPEI, AgNP-PEG. Pri 50 µM,

statistički viša koncentracija srebra zabilježena je nakon tretmana s AgNP-citrat u odnosu na AgNP-bPEI, AgNP-PEG. Pri 75 µM statistički najniža koncentracija srebra izmjerena je nakon tretmana s AgNP-bPEI u odnosu na tretmane AgNP-citrat i AgNP-PEG. Pri 100 µM izmjerena je statistički viša koncentracija srebra nakon tretmana s AgNP-citrat u odnosu na tretmane AgNP-bPEI i AgNP-PEG. Pri 125 µM statistički jednaka koncentracija srebra zabilježena je nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNP-PEG. Nadalje, pri 125 µM statistički najniža koncentracija srebra izmjerena je nakon tretmana s AgNP-bPEI u odnosu na AgNP-citrat i

AgNP-PEG. Pri 150 μM statistički jednaka koncentracija srebra zabilježena je nakon tretmana s AgNP-bPEI i AgNP-PEG. Nadalje, pri 150 μM izmjerena je statistički najviša koncentracija srebra nakon tretmana s AgNP-citrat u odnosu na tretmane AgNP-bPEI i AgNP-PEG.



Slika 18. Raspon mjerenih koncentracija srebra u tkivu klijanaca duhana desetog dana tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG pri koncentracijama 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM i 150 μM . Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti logaritmiranih koncentracija srebra \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ($p < 0.05$, Duncan test).

5. RASPRAVA

Nanočestice srebra (AgNP) koriste se u mnogim komercijalno dostupnim proizvodima kao što su: pesticidi, proizvodi tekstilne industrije i medicinski proizvodi. Budući da se koriste od davnina, postavlja se pitanje sigurnosti njihove upotrebe za okoliš i zdravlje ljudi. Naime, smatra se da biljke imaju značajnu ulogu u akumulaciji i bioraspodjeli ekoloških tvari te da su pod utjecajem AgNP-a koje se nagomilavaju u hranidbenim lancima.

U svom diplomskom radu analizirala sam sadržaj srebra (Ag) u tkivu klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.), u zaostalom talogu MS medija i otopini u kojoj su klijale sjemenke te promjenu stabilnosti AgNP u MS mediju. Svoje istraživanje započela sam analizom koncentracije srebra u hranidbenom mediju (MS mediju) nakon koje sam utvrdila da MS medij ne sadrži srebro. Međutim, hranjiva podloga na kojoj se uzgajaju biljke duhana treba sadržavati sve potrebne nutrijente i organske tvari koje ne utječu na promjenu stope rasta koja je uobičajena i na promjenu uobičajenog prinosa biljaka duhana (Murashige i Skoog 1962). Tijekom cijelog istraživanja koristila sam isti hranidbeni medij. Nadalje, bitan je kemijski sastav MS medija jer kemijske vrste u njemu reagiraju s dodanim nanočesticama srebra i ionskim srebrom. Nadalje, Stebounova i suradnici u svom istraživanju 2010. godine naglašavaju utjecaj ionske jakosti medija na agregaciju nanočestica. Oni su koristili simulirane biološke medije (Gambles i ALF-a) te zaključili da u medijima čija je ionska jakost visoka dolazi do veće stope agregacije nanočestica srebra u odnosu na medije niže ionske jakosti.

Osim toga, vrsta hranidbenog medija utječe na to kako će nanočestice srebra i ionsko srebro djelovati na same biljke. Banić u svom istraživanju 2017. godine koristi MS medij (Murashige i Skoog (1962)) s polovičnom koncentracijom makroelementata kakav je korišten i u ovom istraživanju. Banić zaključuje da svi tretmani srebrom inhibiraju rast korjena klijanaca duhana, no postavlja se pitanje bi li rezultati bili takvi da je koristila neki drugi medij. U budućim istraživanjima mogao bi se koristiti neki drugi hranidbeni medij i mjeriti koncentracija srebra u biljci duhana nakon tretmana s AgNP odnosno ionskim srebrom. Tejamaya i sur. zaključili su da isti tip nanočestica različito agregira ovisno o tipu medija. Tako na primjer TEM slike AgNP-citrat u mediju s kloridima (CM) pokazuju manju veličinu nanočestica u odnosu na veličinu istih čestica u mediju s nitratima (NM) i mediju sa sulfatima (SM).

U svom istraživanju proučavala sam utjecaj MS medija na AgNP stabilizirane trima vrstama omotača: negativno nabijenim citratom (AgNP-citrat), pozitivno nabijenim polietileniminom (AgNP-bPEI) i neutralnim polietilen glikolom (AgNP-PEG), u hranidbenom mediju desetog dana tretmana. Pomoću transmisivnog elektronskog mikroskopa utvrdila sam da čestice različito agregiraju ovisno o primijenjenoj koncentraciji tretmana. TEM slike pokazuju da AgNP-citrat u MS mediju pokazuju veći stupanj agregacije što je primijenjena

koncentracija AgNP-citrata veća. Takav trend u agregaciji pokazuje i AgNP-PEG. Mogući uzrok tome je taj da veća koncentracija nanočestica srebra doprinosi većoj ionskoj jakosti, što potvrđuje iduća formula:

$$\mu = \sum ci zi^2$$

gdje je μ ionska jakost, ci koncentracija, zi naboj iona. Nadalje, što je veća ionska jakost to je veći i stupanj agregacije nanočestica. Međutim, nije poznat naboj kemijskih vrsta koje se nalaze u sustavu kada pomiješamo MS medij i AgNP. Jasno je da je AgNP-citrat negativno nabijen, AgNP-bPEI pozitivno nabijen, AgNP-PEG neutralan no postavlja se pitanje kakav je naboj kemijskih vrsta kada su u sustavu prisutni medij i nanočestice. Međutim poznato je da su AgNP u različitim medijima nestabilne što potvrđuju Tejamaya i sur. 2012. godine. Oni su uočili da nakon što pomiješaju AgNP-citrat i medij (tip CM), unutar par sekundi žuta otopina prelazi u sivu što može upućivati na nastanak novih kemijskih vrsta i nestabilnost samih nanočestica i te su tvrdnje dokazali UV-VIS spektroskopskom metodom te mjerenjem pH. U svom istraživanju zamijetila sam nagle i brze promjene boje otopine nakon što sam pomiješala nanočestice srebra i MS medij što može upućivati na nestabilnost AgNP i nastanak novih kemijskih vrsta. Međutim, odmah nakon što sam pomiješala MS medij i AgNP nisam uočila promjene u agregaciji i veličini na TEM slikama, ali nakon deset dana tretmana promjene su vidjive. U budućim istraživanjima stabilnost AgNP-a mogao bi se mjeriti potencijal čestica pomoću Zeta size uređaja i pratiti promjena apsorbancije valnih duljini pomoću UV-VIS spektrofotometra. Spektrofotometrija u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra ima značajnu primjenu u kvantitativnoj analizi. Stebounova i suradnici 2010. godine koristili su spektrofotometrijsku UV-VIS metodu za praćenje sedimentacije AgNP u simuliranom biološkom mediju (Gamble's, ALF). Isti znanstvenici zaključili su da AgNP ne otpuštaju ione u simuliranom biološkom mediju.

Zeta potencijal (elektrokinetički potencijal) ukazuje na stupanj elektrostatske odbojnosti između susjednih, slično nabijenih čestica. Dakle što je zeta potencijal viši to je sustav stabilniji i manje podložan agregaciji.

Analizom koncentracije srebra u hranidbenom mediju u prisutnosti nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG) odnosno ionskog srebra prije dodavanja sjemenki duhana utvrdila sam da koncentracija srebra u mediju raste kako raste primijenjena koncentracija AgNP odnosno ionskog srebra. Time je potvrđena pretpostavka da će koncentracija srebra u hranidbenom mediju rasti kako raste primijenjena koncentracija AgNP odnosno ionskog srebra. Međutim, izmjerene koncentracije srebra bile su niže u odnosu na očekivane teorijske koncentracije što može upućivati na nestabilnost AgNP-a i iona srebra u MS mediju. Međutim, kada sam u sustav kojeg čine MS medij i AgNP odnosno AgNO₃ dodala

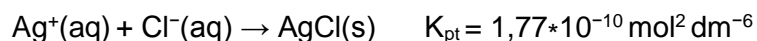
sjemenke duhana, sustav postaje složeniji te je bilo teško predvidjeti na koji način će kemijske vrste reagirati i kolika će biti koncentracija srebra u otopini, talogu i tkivu biljaka nakon desetog dana tretmana. Naime, poznato je da AgNP u određenom tipu medija otpuštaju ione srebra koji se mogu izmjenjivati s ionima u živom sustavu (npr. biljke) (Stebounova i sur. 2010). Nadalje, priprema uzoraka za mjerenje metodom ICP-AES bila je složena i zahtijevala je mikrovalnu digestiju tkiva biljke i ostale metode spomenute u poglavlju Rezultati. Kvaliteta mjerne procedure analizirana je kemometrijskim alatima i prikazana box-plot dijagramima. Odstupanja u koncentraciji srebra unutar serije mjerenja uzrokovana su uglavnom efektom složene matrice, a kvaliteta mjerne procedure veća je kod mjerenja pri nižim primijenjenim koncentracijama AgNP jer pri višim koncentracijama AgNP agregiraju, nestabilne su što rezultira manjom kvalitetom mjerne procedure. Za dodatno određivanje točnosti mjerenih rezultata, u budućim istraživanjima mogu se uvrstiti mjerenja atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (AAS) ili spektrometrijom masa (ICP-MS) na setu istih ekeprimenata. Tako bi se proširio set podataka nužnih za bolje definiranje točnosti određivanja sadržaja srebra u sustavima s AgNP. Osim toga, sjemenke duhana koje su korištene u ovom istraživanju sadržavale su određenu koncentraciju srebra (oko 50 ppm) koja nije jednaka za sve sjemenke iako je uzet isti tip sjemenki sorte Berley, istog proizvođača. U budućim istraživanjima mogle bi se koristiti sjemenke duhana različitih sorti i proizvođača i usporediti dobivene rezultate. Nadalje, kontrolne biljke klijale su u MS mediju bez dodatka AgNP odnosno AgNO_3 . Utvrdila sam da talog i otopina kontrolnih uzoraka ne sadrži srebro dok tkivo klijanaca kontrolnog uzorka može sadržavati srebro. Mogući razlog tome je taj da sjemenke duhana sadrže određenu koncentraciju srebra koja se kasnije očituje kao srebro u tkivu kontrolnih klijanaca.

U svom diplomskom radu htjela sam utvrditi koncentraciju srebra u otopini u kojoj je klijala biljka duhana, zaostalom talogu u hranidbenom mediju te tkivu cijelih klijanaca duhana desetog dana tretmana ionskim srebrom i nanočesticama srebra stabiliziranih s tri tipa omotača. Budući da AgNP otpuštaju ione srebra (Ag^+), u svom istraživanju mjerila sam koncentraciju slobodnih Ag^+ iona. Koristila sam sljedeće organske omotače nanočestica srebra: citrat, polietilen glikol (PEG) i razgranati polietilenamin (bPEI). Pretpostavila sam da vrsta omotača AgNP utječe na koncentraciju srebra. Osim toga, pretpostavila sam da će se koncentracija srebra nakon tretmana ionskim srebrom razlikovati od koncentracije srebra nakon tretmana različito stabiliziranih AgNP. Utvrdila sam da koncentracija srebra u otopini nakon svih provedenih tretmana većinom raste kako raste i primijenjena koncentracija AgNP odnosno AgNO_3 . Pri nižim primijenjenim koncentracijama (25 μM , 50 μM , 100 μM) nema statistički značajne razlike u koncentraciji srebra u otopini nakon tretmana AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG. Ako promatramo odnos tretmana AgNO_3 s tretmanima AgNP onda tretman s AgNO_3 pokazuje statistički najslabije rezultate u koncentraciji srebra u otopinu u odnosu na

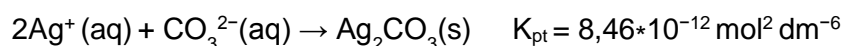
tretman s AgNP-PEG. Nadalje, metodom ICP-AES može se utvrditi koncentracija srebra u otopini, talogu i tkivu klijanaca duhana, ali i dalje ostaje nepoznato koje kemijske vrste i koje jednadžbe kemijskih reakcija objašnjavaju tu koncentraciju. Naime, izmjerena koncentracija srebra može biti posljedica otpuštanja iona srebra iz AgNP. Otpuštanje iona srebra iz AgNP veće je što su nanočestice manjih dimenzija te je veće pri rastu temperature s 4 na 37 °C (Sharma i sur. 2013). Najvažnije činjenice koje govore o bioraspoloživosti AgNP u mediju su otpuštanje iona srebra, oksidacija srebra, agregacija, stvaranje AgCl i Ag₂S (Behra i sur. 2013).

AgNP su nestabilne te se talože u eksperimentalnom sustavu (MS mediju). Stoga, cilj ovog istraživanja bio je izmjeriti koncentraciju srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju. Rezultati analize koncentracije srebra u zaostalom talogu u hranidbenom mediju desetog dana tretmana klijanaca duhana s AgNP (AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG) i ionskim srebrom ukazuju na pretežno linearan rast koncentracije srebra. Nakon tretmana s AgNP-bPEI uočila sam da je koncentracija srebra u talogu niža u odnosu na ostale tretmane. Nakon tretmana s AgNO₃ zamijetila sam da je koncentracija srebra u talogu viša u odnosu na tretman s AgNP-bPEI, a niža u odnosu na tretmane s AgNP-citrat i AgNP-PEG.

Dokazano je da AgNP otpuštaju ione srebra koji mogu ući u tkivo i akumulirati se u njemu. Sukladno tome, cilj ovog istraživanja bio je izmjeriti koncentraciju srebra u tkivu. Međutim, mjerenje koncentracije srebra u tkivu klijanaca desetog dana tretmana ukazuje na veliku razliku u koncentraciji srebra nakon tretmana s tri tipa nanočestica (AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG) u odnosu na tretman ionskim srebrom. Nakon desetog dana tretmana s AgNO₃ uočeno je da koncentracija srebra u tkivu klijanaca opada i to pri primijenjenim koncentracijama 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM, 150 µM. Navedeno se može objasniti činjenicom da MS medij sadrži kloridne ione (Cl⁻). Kloridni ioni (Cl⁻) reagiraju sa srebrovim ionima (Ag⁺) i nastaje talog srebrovog klorida kao što je prikazano sljedećom jednadžbom kemijske reakcije (Filipović, Lipanović 1985):

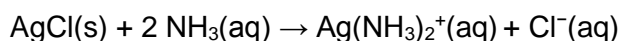


Međutim MS medij koji sadrži molekule vode dolazi u doticaj sa zrakom točnije s ugljikovim dioksidom (CO₂) iz zraka pa MS medij može sadržavati karbonatne ione (CO₃²⁻). Naime, iona srebra (Ag⁺) mogu reagirati s karbonatnim ionima što prikazuje slijedeća jednadžba kemijske reakcije:



Međutim, temeljna i prva reakcija koja se odvija je reakcija u kojoj nastaje talog srebrovog klorida.

Osim toga, budući da MS medij sadrži molekule amonijaka moguće je da one reagiraju s talogom srebrnog klorida dajući kompleksni spoj što je prikazano u slijedećoj jednadžbi kemijske reakcije:



Zbog gore navedenih jednadžbi kemijskih reakcija, pogotovo one u kojoj nastaje talog srebrnog klorida, koncentracija srebra u tkivu klijanaca duhana nakon tretmana ionskim srebrom opada. Dakle, ioni srebra reagiraju s kloridnim ionima u MS mediju i taloži se AgCl(s) te kao posljedica toga smanjuje se koncentracija srebra u tkivu klijanaca. Pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji ionskog srebra (na prijelazu s 25 μM na 50 μM) uočen je blagi porast u koncentraciji srebra u tkivu klijanaca duhana. Mogući razlog tome je taj što nema dovoljno raspoloživih srebrnih iona (Ag^+) za reakciju s kloridnim ionima iz medija (Cl^-).

Nakon tretmana s AgNP (AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG) uočeno je da koncentracija srebra u tkivu raste što je suprotno u odnosu na tretman ionskim srebrom. Za nanočestice srebra karakterističan je niz reakcija koje još nisu dovoljno istražene. Nakon tretmana s AgNP-bPEI koncentracija srebra u tkivu klijanaca niža je od koncentracije srebra nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNP-PEG pri koncentracijama 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM . Naime, sigurno je da omotači AgNP utječu na stabilnost i toksičnost nanočestica srebra u biološkim sustavima. Transformacija organski omotanih AgNP uzrokovana je: promjenom pH, vrstom omotača, vrstom elektrolita, ionskom jakošću, redox reakcijama i svjetlošću (Sharma i sur. 2013). Dakle, mnogo parametara utječe na transformaciju nanočestica srebra, a samim time i na koncentraciju srebra. Zhang i suradnici 2009. godine tretirali su pamuk s različitim koncentracijama nanočestica srebra i ionskog srebra te zaključili da koncentracija srebra u pamuku raste s porastom primijenjene koncentracije AgNP odnosno AgNO_3 . Međutim, treba uzeti u obzir da svaki biološki sustav reagira različito s AgNP i ionskim srebrom. Osim toga, treba uzeti u obzir činjenicu da otapanje nanočestica srebra ovisi o površini, veličini, agregaciji i sastavu nanočestica (Mirsa i sur. 2012).

Većina istraživačkih radova bavi se utjecajem AgNP i AgNO_3 na živa bića, a ne količinom srebra u živim bićima, nakon tretmana s AgNP odnosno s AgNO_3 . Jedno istraživanje govori kako je koncentracija srebra u izbojcima bundeve (*Cucurbita pepo* L.) 4,7 puta veća u biljkama izloženim koncentraciji od 10 mg L^{-1} do 1000 mg L^{-1} AgNP od onih tretiranih s prahom Ag(s) (Sharma i sur. 2013).

Poznato je da Ag^+ ioni otpušteni iz AgNP oštećuju membrane stanica i utječu na ekspresiju gena (Sharma i sur. 2013). Budući da su biljke izravno ili neizravno pod utjecajem nanočestica srebra koje se akumuliraju u hranidbenom lancu jasno je da se mnoga istraživanja bave utjecajem istih na biljke. Provedeno je istraživanje u kojem je smeđa gorušica (*Brassica*

juncea L.) podvrgnuta tretmanu s AgNP nakon kojeg nije ustanovljena akumulacija srebra u bilo kojem dijelu biljke (Sharma i sur. 2013). Osim toga, u korijenu biljki *Phaseolus radiatus* L. i *Sorghum bicolor* L. nakon tretmana s AgNP ustanovljena je određena količina srebra (Sharma i sur. 2013). Nadalje, AgNP i AgNO₃ uzrokovali su inhibiciju rasta vodene leće (*Lemna minor* L.), a veći stupanj inhibicije rasta pokazuje AgNO₃ (Gubbins i sur. 2011). Silva i Pohrel 2013. godine proveli su istraživanje na velikoj vodenbuhi (*Daphnia magna*) i bakteriji *Escherichia coli* i ustvrdili su da nanočestice stabilizirane određenim omotačem pokazuju trend toksičnosti za navedene organizme u odnosu na ionsko srebro (AgNO₃) sljedećim redom AgNO₃ > AgNP-bPEI > AgNP-citrat. Površina nanočestica i organski omotači utječu na transport i pokretljivost nanočestica u okolišu (Sharma i sur. 2013).

Posljednjih nekoliko godina srebrov nitrat je korišten u istraživanjima gdje je dokazano da inhibira etilensku aktivnost u biljkama te kod nekih biljaka pokazuje citotoksični učinak (Kumar i sur. 2009). Međutim, utjecaj srebrovog nitrata nije jednak za sve vrste biljaka. Osim toga, utjecaj srebrovog nitrata i nanočestica srebra na biljke ovisi o starosti biljaka, ali i o mediju u kojem se uzgajaju biljke. Istražen je učinak nanočestica srebra i ionskog srebra na oksidacijski stres u biljkama duhana te je utvrđeno da je ionsko srebro toksičnije za biljke duhana od nanosrebra, a jači učinci zabilježeni su u korijenu u odnosu na listove (Bajan 2017). Nadalje provedeno je istraživanje u kojem je utvrđeno da ionsko srebro jače inhibira rast korjenčića luka od nanosrebra (Milošić 2014), no treba imati na umu različit utjecaj AgNO₃ i AgNP na biljke različite starosti. Naime, Banić je u svom istraživanju 2017. godine koristila istu sortu klijanaca duhana, jednake starosti kao što su korišteni u ovom istraživanju. Banić je zaključila da svi tretmani srebrom uzrokuju promjene u strukturi korijenovog vrška klijanaca duhana, a nanočestice pokazuju međusobno sličan učinak, jači od iona srebra. Osim toga, Banić zaključuje da su nanočestice srebra pri koncentraciji 100 µM toksičnije za klijance duhana od ionskog srebra iste koncentracije. Naime, uočila sam da je koncentracija srebra u tkivu klijanaca duhana viša nakon tretmana s AgNP u odnosu na tretman s AgNO₃, pri višim primijenjenih koncentracija, a viša koncentracija srebra može se povezati s većom toksičnošću.

6. ZAKLJUČAK

- U matičnim otopinama AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG, čestice imaju ujednačen sferičan oblik i veličinu oko 50 nm. Pojavljuju se pojedinačno ili u nakupinama.
- U talogu tekućeg hranidbenog medija (MS medij) desetog dana tretmana klijanca duhana (*Nicotiana tabacum* L.) s AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG i AgNO₃ čestice srebra su uglavnom sfernog oblika, ali različitih veličina (raspon od 20 nm do 120 nm). Pojavljuju se pojedinačno ili u nakupinama te agregiraju.
- U MS mediju nije izmjerena koncentracija srebra dok je u sjemenkama izmjerena koncentracija srebra u rasponu od 24 do 54 µg g⁻¹.
- Koncentracije srebra u MS mediju u prisutnosti AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG odnosno AgNO₃ prije dodavanja sjemenki duhana raste kako raste primijenjena koncentracija AgNP odnosno ionskog srebra iako su mjerene vrijednosti niže od računskih što upućuje na nestabilnost čestica srebra u MS mediju te početak njegovog taloženja.
- Talog i otopina kontrolnih uzoraka ne sadrži srebro, a u tkivu kontrolnih klijanaca mjerimo koncentraciju srebra u rasponu od 1,8 do 27,2 µg g⁻¹.
- Kvaliteta mjerne procedure za tkivo viša je pri nižim koncentracijama za tretman AgNP (zbog veće agregacije AgNP-a), ali je viša pri višim koncentracijama za tretman AgNO₃ jer je tada koncentracija srebra u tkivu niža te je manja agregacija čestica.
- Nakon tretmana s AgNP-citrat, AgNP-bPEI i AgNP-PEG koncentracija srebra raste linearno kako raste primijenjena koncentracija AgNP. Najviša koncentracija srebra izmjerena je u tkivu, zatim u talogu te je najniža izmjerena u otopini MS medija.
- Nakon tretmana ionskim srebrom najviša koncentracija srebra pri 25 µM, 50 µM i 75 µM izmjerena je u tkivu, zatim u talogu a najniža u otopini. Pri 100 µM i 125 µM najviša koncentracija srebra izmjerena je u taloga a podjednake vrijednosti su bile u tkivu i otopini. Pri 150 µM najniža koncentracija srebra izmjerena je u tkivu, a najviša u talogu.
- Koncentracije srebra u otopini nakon tretmana s AgNP i AgNO₃ bile su ujednačene. Koncentracija srebra u talogu bila je najniža u AgNP-bPEI u odnosu na AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNO₃ dok je koncentracija srebra u tkivu bila najniža u AgNO₃ u odnosu na sve AgNP.

7. LITERATURA

Atkins P., Overton T., Rourke J., Weller M., Armstrong F. (2009): Inorganic Chemistry, 5. iz. Oxford university press, Oxford, 653-660.

Bajan Ž. (2017): Oksidacijski stres u biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.) izloženim nanočesticama, diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Balen B. (2016): Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra, *Educatio Biologiae*, 2:115-131.

Banić E. (2017): Promjene u ultrastrukturi, proteomu i fotosintetskoj učinkovitosti klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.) pod utjecajem nanočestica i iona srebra, diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Behra R., Sigg L., Clift M., Herzog F., Mingetti M., Johnstone B. (2013): Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective, *Journal of the royal society interface*, 10-14.

Beer C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland D.S., Autrup, H. (2012): Toxicity of silver nanoparticles - Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters*, 208:286-292.

Boss C. B., Freedeen K. J. (1999): Instrumentation and Tehniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ed. 2 nd. Perkin Elmer Corporation, USA, 3:2-33.

Bhushan B. (2010): Springer Handbook of Nanotechnology, ed. 3rd. Springer Science & Business Media, USA,1-12.

Ćurković-Perica M. (1993): Regeneracija kultivara C 104 Burley duhana iz meristema i primordijalnih listića aksilarnih pupova, *Agronomski glasnik*, 427-433.

Eftaiha A., El-Nour M., Al-Warthan A., Ammar A. A. (2009): Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arabian Journal of Chemistry*, 136-139.

Filipović I., Lipanović S. (1985): Opća i anorganska kemija, 5. izdanje. Školka knjiga, Zagreb, 1067-1085.

Gubbins E.J., Batty, L.C. &Lead, J. R.. (2011): Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution*, 159:1551–1559.

Holler J. F., Skoog A., Crouch S.R. (2007): Principles of Instrumental analysis, 6. iz. Thomson/Brooks/Cole, Belmont USA, 132-332.

Kumar V., Parvatam G., Aswathanarayana Ravishankar G. (2009): AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator, *Electronic Journal of Biotechnology*, 2:1-15.

Liu J., Jiang G (2015): Silver nanoparticles in the environment. Springer Science & Business Media, USA, 29-32.

Luoma S. N. (2008): Silver nanotechnology and the environment: Old problems or new challenge? The Pew charitable trusts, Philadelphia, 9-61.

Milošić A. (2014): Utjecaj nanočestica srebra i pojavu oksidacijskog stresa u korjenčićima luka (*Alium cepa* L.), diplomski rad, Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb

Mirsa K. S., Dybowska A., Berhanu D., Luoma N. S., Valsami-Jones E. (2012): The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies, *Science of the Total Environment*, 438, 225–232

Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. University of Wisconsin, USA

Nalwa H. S. (1999): Handbook of Nanonstructured Materials and Nanotechnology. Academic Press, San Diego, USA, 1-52.

Nowack B., Height M., Krug F. H. (2011): 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers, *Environmental Science and Technology*, 45:1177-1183.

Rico C. M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J. L. (2011): Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59:3485–3498

Sekhon, B.S., 2014. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology Science and Applications*, 20, pp. 31-53.

Sharma K. V., Siskova M. K., Zboril R., Gardea-Torresdey J. L. (2013): Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity, *Advances in Colloid and Interface Science*, 204:15–34.

Sharon, M. et al.(2010): Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *Journal of Phytology*, 2, pp.83-92.

Silva T., Pokhrel R. L., Dubey B., Tolaymat T. M., Maier K. J., Liu X. (2013): Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity, *Science of the Total Environment*, 468–469, 968–976.

Stebounova L. V., Grassian H. V., Guio E. (2010): Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution, *Research paper*, 13:232-242.

Tejamaya M., Römer I., Merrifield R. C., Lead J. R. (2012): Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media, *Environment Science and Technology*

Veljković V. B., Lakićević S. H., Lazić M. L., Stamenković O. S., Todorović Z. B. (2006): Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids, *Elsevier*, 85:2671–2675.

Vranova E., Atichartpongku S., Inze´ D., Van Camp W., Van Montagu M., Villarroel R. (2002): Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress, Department of Plant Systems Biology Ghent, Belgium, 16: 10870–10875.

Zhang F., Chen Y., Lin H., Wu X. (2009): Application of Silver Nanoparticles to Cotton Fabric as an Antibacterial Textile Finish, *Fibers and Polymers*, Vol.10, 4:496-501.

Wang Z. L. (1999): Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. School of Materials Science and Engineering, Georgia, 104:1153-1175.

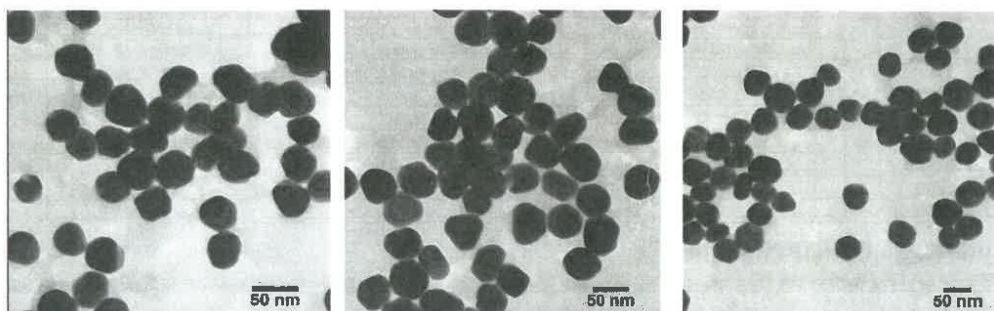
Prilog 1



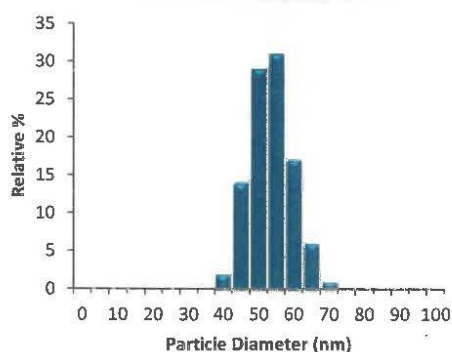
50 nm Silver Nanospheres, Citrate, NanoXact™

Lot Number: HKE0003

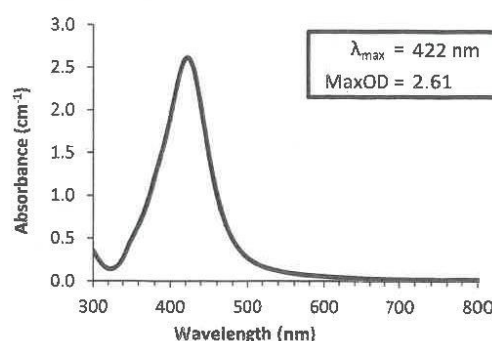
Diameter (TEM):	51 ± 6 nm	Hydrodynamic Diameter:	51 nm
Coefficient of Variation:	11.4 %	Zeta Potential:	-48 mV
Surface Area (TEM):	11.0 m ² /g	pH of Solution:	8.1
Mass Concentration (Ag):	0.021 mg/mL	Silver Purity:	99.99 %
Particle Concentration:	3.0E+10 particles/mL	Particle Surface:	Sodium Citrate
		Solvent:	Aqueous 2mM Citrate



Size Distribution



Optical Properties



Characterization Instrumentation

Diameter and Size Statistics:
Mass Concentration:
Spectral Properties:
Hydrodynamic Diameter/Zeta Potential:

JEOL 1010 Transmission Electron Microscope
Thermo Fisher X Series 2 ICP-MS
Agilent 8453 UV-Visible Spectrometer
Malvern Zetasizer Nano ZS.

Storage: 2-8 °C away from light. DO NOT FREEZE.

nanoComposix, Inc
4878 Ronson Ct. Suite K
San Diego, CA 92111

nanoComposix.com

info@nanocomposix.com
Phone: (858) 565-4227
Fax: (619) 330-2556

Slika P1: Specifikacije komercijalno dostupnih nanočestica srebra stabiliziranih pomoću negativno nabijenog citratnog aniona (AgNP-citrat) korištenih u ovom radu.

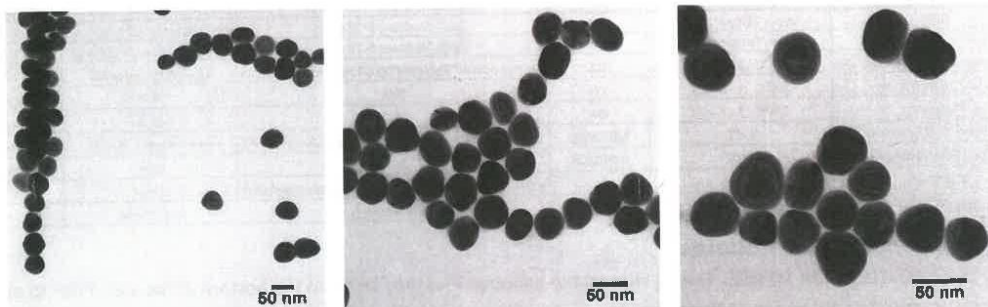
Prilog 2



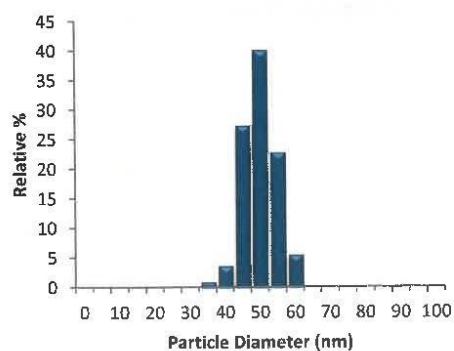
50 nm Silver Nanospheres, BPEI, NanoXact™

Lot Number: SCM0150

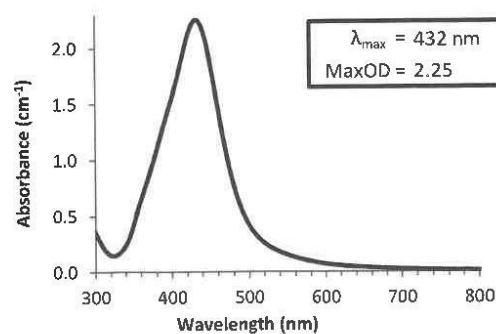
Diameter (TEM):	47 ± 5 nm	Hydrodynamic Diameter:	66 nm
Coefficient of Variation:	10.2 %	Zeta Potential:	73 mV
Surface Area (TEM):	11.8 m ² /g	pH of Solution:	5.6
Mass Concentration (Ag):	0.022 mg/mL	Silver Purity:	99.99 %
Particle Concentration:	3.80E+10 particles/mL	Particle Surface:	bPEI
		Solvent:	Milli-Q Water



Size Distribution



Optical Properties



Characterization Instrumentation

Diameter and Size Statistics:

Mass Concentration:

Spectral Properties:

Hydrodynamic Diameter/Zeta Potential:

JEOL 1010 Transmission Electron Microscope

Thermo Fisher X Series 2 ICP-MS

Agilent 8453 UV-Visible Spectrometer

Malvern Zetasizer Nano ZS.

Storage: 2-8 °C away from light. DO NOT FREEZE.

nanoComposix, Inc
4878 Ronson Ct. Suite K
San Diego, CA 92111

nanoComposix.com

info@nanocomposix.com
Phone: (858) 565-4227
Fax: (619) 330-2556

Slika P2: Specifikacije komercijalno dostupnih nanočestica srebra stabiliziranih pomoću pozitivno nabijenog razgranatog polietilenimin kationa (AgNP-bPEI) korištenih u ovom radu.

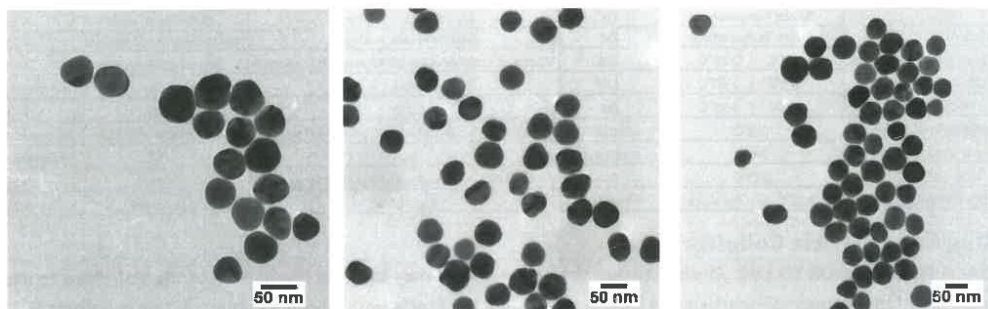
Prilog 3



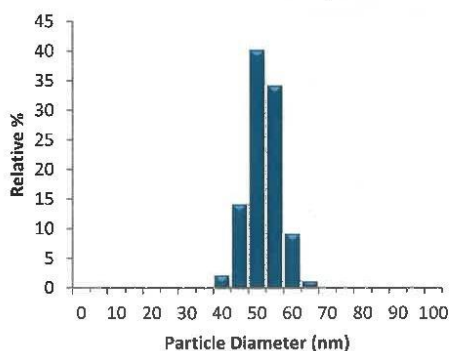
50 nm Silver Nanospheres, PEG, NanoXact™

Lot Number: ECP1470

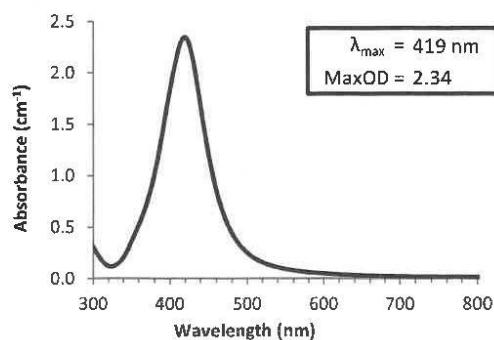
Diameter (TEM):	49 ± 4 nm	Hydrodynamic Diameter:	81 nm
Coefficient of Variation:	9.0 %	Zeta Potential:	-25 mV
Surface Area (TEM):	11.4 m ² /g	pH of Solution:	5.8
Mass Concentration (Ag):	0.020 mg/mL	Silver Purity:	99.99 %
Particle Concentration:	3.1E+10 particles/mL	Particle Surface:	mPEG 5 kDa
		Solvent:	Milli-Q Water



Size Distribution



Optical Properties



Characterization Instrumentation

Diameter and Size Statistics:	JEOL 1010 Transmission Electron Microscope
Mass Concentration:	Thermo Fisher X Series 2 ICP-MS
Spectral Properties:	Agilent 8453 UV-Visible Spectrometer
Hydrodynamic Diameter/Zeta Potential:	Malvern Zetasizer Nano ZS.

Storage: 2-8 °C away from light. DO NOT FREEZE.

nanoComposix, Inc.
4878 Ronson Ct. Suite K
San Diego, CA 92111

nanoComposix.com

info@nanocomposix.com
Phone: (858) 565-4227
Fax: (619) 330-2556

Slika P3: Specifikacije komercijalno dostupnih nanočestica srebra stabiliziranih pomoću neutralnog polietilen-glikola (AgNP-PEG) korištenih u ovom radu.

Prilog 4

Tablica P4: Mase osušenog tkiva klijanaca duhana, sjemenki i referentnog uzorka listova rajčice (CRM) za tretmane s AgNP (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG) i AgNO₃

Tretman AgNP- citrat	<i>m</i> (tkivo) (g)	Tretman AgNP- bPEI	<i>m</i> (tkivo) (g)	Tretman AgNP-PEG	<i>m</i> (tkivo) (g)	Tretman AgNO ₃	<i>m</i> (tkivo) (g)
K1	0,0692	K1	0,0802	K1	0,07382	K1	0,08848
K2	0,0757	K2	0,0654	K2	0,08489	K2	0,09446
K3	0,0742	K3	0,0815	K3	0,07425	K3	0,09562
K4	-	K4	0,0694	K4	0,08441	K4	0,06719
K5	-	-	-	K5	0,09288	K5	-
25-1	0,0727	25-1	0,0697	25-1	0,07682	25-1	0,09336
25-2	0,0700	25-2	0,0748	25-2	0,07629	25-2	0,08909
25-3	0,0622	25-3	0,0713	25-3	0,07790	25-3	0,08762
25-4	0,0697	25-4	0,0734	25-4	0,08347	25-4	0,09017
25-5	0,0728	25-5	0,0676	25-5	0,08262	25-5	-
50-1	0,0660	50-1	0,0810	50-1	0,07481	50-1	0,09125
50-2	0,0748	50-2	0,0723	50-2	0,07795	50-2	0,09547
50-3	0,0706	50-3	0,0766	50-3	0,07585	50-3	0,08988
50-4	0,0685	50-4	0,0761	50-4	0,07893	50-4	0,09268
50-5	0,0674	50-5	0,0619	50-5	0,07686	50-5	-
75-1	0,0612	75-1	0,0722	75-1	0,05548	75-1	0,09202
75-2	0,0588	75-2	0,0679	75-2	0,07304	75-2	0,08891
75-3	0,0625	75-3	0,0681	75-3	0,07054	75-3	0,08988
75-4	0,0548	75-4	0,0559	75-4	0,07655	75-4	0,09198
75-5	0,0579	75-5	0,0702	75-5	0,07996	75-5	-
100-1	0,0467	100-1	0,0649	100-1	0,06757	100-1	0,09106
100-2	0,0549	100-2	0,0610	100-2	0,05481	100-2	0,08633
100-3	0,0556	100-3	0,0598	100-3	0,06490	100-3	0,09173
100-4	0,0525	100-4	0,0658	100-4	0,05658	100-4	0,09529
100-5	0,0508	100-5	0,0502	100-5	0,06616	100-5	
125-1	0,0367	125-1	0,0315	125-1	0,04306	125-1	0,09686
125-2	0,0435	125-2	0,0511	125-2	0,04896	125-2	0,08565
125-3	0,0473	125-3	0,0459	125-3	0,05073	125-3	0,09477
125-4	0,0464	125-4	0,04573	125-4	0,04513	125-4	0,08740
125-5	0,0453	125-5	0,03684	125-5	0,04670	125-5	-
150-1	0,0382	150-1	0,04527	150-1	0,04156	150-1	0,08935
150-2	0,0407	150-2	0,04666	150-2	0,04803	150-2	0,09566
150-3	0,0346	150-3	0,04480	150-3	0,03894	150-3	0,09370
150-4	0,0393	150-4	0,04663	150-4	0,03807	150-4	0,0890
150-5	0,0370	150-5	0,03410	150-5	0,04400	150-5	-
Sjemenke	0,0752	Sjemenke	0,06464	Sjemenke	0,07551	Sjemenke	0,06650
CRM	0,2002	CRM	0,20054	CRM	0,20010	CRM	0,20014

Prilog 5

Tablica P5: Izmjerene koncentracije srebra metodom ICP-AES (atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu) u otopini, talogu i tkivu desetog dana tretmana s AgNP (AgNP-citrat, AgNP-bPEI, AgNP-PEG)

	Otopina c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Talog c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Tkivo c ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Citrat	bEPI	PEG	Citrat	bPEI	PEG	Citrat	bPEI	PEG
25-1	0,495	0,612	0,704	1,534	0,899	0,85	42,99	30,82	22,62
25-2	0,499	0,571	0,725	0,789	1,031	1,051	23,27	8,159	16,65
25-3	0,744	0,624	0,589	1,109	0,487	0,827	50,35	7,991	33,79
25-4	1,088	0,836	0,779	1,573		0,622	28,97	9,764	29,08
25-5	0,600	0,844	0,487	1,236		0,783	44,09	28,53	22,03
50-1	1,634	2,069	0,843	5,127	1,637	2,287	22,94	18,48	23,93
50-2	1,894	2,249	2,267	3,634	1,811	3,388	55,64	10,36	25,05
50-3	1,717	2,328	2,679	4,265	1,644	2,676	19,45	23,53	37,57
50-4	2,581	1,946	1,884	5,453		2,381	44,25	28,79	31,29
50-5	2,074	2,313	2,145	3,103		2,341	56,16	28,62	36,07
75-1	2,179	2,649	2,692	6,163	3,614	7,581	34,86	13,97	31,59
75-2	2,380	2,533	2,844	8,98	4,077	5,859	36,46	50,58	49,25
75-3	2,565	2,705	2,291	9,5	2,923	5,098	66,81	14,56	50,57
75-4	2,125	2,757	2,783	10,63		5,12	60,64	11,13	43,57
75-5	2,987	2,420	2,854	9,777		6,727	23,80	18,23	49,18
100-1	1,660	1,755	2,377	14,67	4,321	17,13	57,36	19,54	21,87
100-2	2,322	1,975	3,554	12,94	4,025	10,62	46,75	26,41	36,22
100-3	2,218	1,618	3,635	13,39	2,813	10,41	41,98	20,49	71,45
100-4	2,714	1,846	2,428	14,03		13,65	45,59	46,57	46,30
100-5	1,852	1,585	3,813	13,87		6,131	77,76	39,75	57,59
125-1	3,095	1,093	1,793	16,18	7,245	23,6	52,00	56,66	123,5
125-2	3,790	2,252	2,522	19,26	5,568	20,35	128,39	46,11	69,08
125-3	4,011	2,599	3,307	19,37	9,329	22,52	57,42	42,68	71,31
125-4	4,012	2,386	2,586	19,1		19,45	51,59	55,78	96,66
125-5	4,387	3,582	2,824	16,22		19,32	292,09	30,46	81,05
150-1	6,158	5,714	2,706	28,17	9,074	27,34	145,88	47,94	141,6
150-2	7,506	6,439	2,947	20,34	10,06	28,49	288,27	40,46	120,6
150-3	6,557	6,039	2,360	24,8	8,2	31,23	473,75	71,00	129,8
150-4	7,221	5,985	8,592	28,83		24,19	144,96	187,0	62,91
150-5	7,627	5,224	3,801	29,76		26,13	90,59	426,1	67,78

Prilog 6

Tablica P6: Izmjerene koncentracije srebra metodom ICP-AES (atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu) u otopini, talogu i tkivu desetog dana tretmana s AgNO_3 .

	Otopina c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Talog c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tkivo c ($\mu\text{g g}^{-1}$)
25-1	0,780	0,728	10,52
25-2	0,661	0,905	9,989
25-3	0,568	0,462	31,81
25-4	0,544	0,603	9,953
50-1	1,244	2,786	39,80
50-2	0,810	2,731	20,18
50-3	0,572	1,267	46,39
50-4	1,731	3,369	60,39
75-1	2,615	4,899	35,10
75-2	2,423	6,643	24,29
75-3	2,180	4,849	13,19
75-4	1,975	4,078	26,79
100-1	3,135	7,250	67,37
100-2	5,254	13,00	13,93
100-3	2,380	10,91	7,086
100-4	2,175	8,628	5,955
125-1	2,702	11,68	6,065
125-2	2,926	17,40	7,443
125-3	1,775	16,70	17,75
125-4	3,217	15,88	13,98
150-1	4,090	14,51	7,18
150-2	3,372	17,86	7,578
150-3	3,718	19,27	8,484
150-4	3,763	20,95	13,83

Životopis

Rođena sam 13. srpnja 1992. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Remete i VII. Gimnaziju s odličnim uspjehom. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisala sam u akademskoj godini 2012./2013. te ga trenutno završavam. Kroz takav studijski program, stekla sam mnoga teorijska i praktična znanja iz biologije, kemije i metodike nastave tih predmeta. Tijekom studija odradila sam uspješno metodičku praksu iz nastave biologije u OŠ Sesvetski Kraljevec i metodičku praksu iz nastave kemije u Zdravstvenom učilištu u Zagrebu. 2017. godine sudjelovala sam kao koautor na Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera s posternim priopćenjem naslova „ICP-OES analysis of silver in tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum*) treated with silver nanoparticles.“ Govorim i pišem engleski i španjolski jezik te sam informatički pismena. Spremna sam na timski rad u poslu, ali sam i samostalna.

Kongresna priopćenja:

Bernardo Marciuš, **Zrinka Gale**, Ivan Nemet, Petra Peharec Štefanić, Sanda Rončević (2017): „ICP-OES analysis of silver in tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum*) treated with silver nanoparticles.“, Zbornik radova 25. Hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, 261-263. (poster, domaća recenzija, sažetak)